

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

22.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 9月 3日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-257703

[ST.10/C]:

[JP2002-257703]

REC'D 21 MAR 2003

WIPO

PCT

出 願 人

Applicant(s):

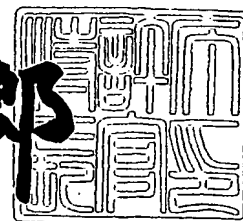
山之内製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 4日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3013174

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003183

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 遠藤 英樹

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 中野 亮介

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 黒▲崎▼ 英志

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 加藤 美雪

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘2 1 山之内製薬株式会社内

    【氏名】 横田 博之

【特許出願人】

    【識別番号】 000006677

    【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100089200

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

    【識別番号】 100109357

    【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PPARを介して作動する副作用の少ないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 効果の高いPPARのリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法。

【請求項2】 糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法。

【請求項3】 浮腫惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法。

【請求項4】 i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融

合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、  
あるいは、

i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞。

【請求項5】 i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、  
あるいは、

i) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を

含み、しかもリガンド依存的に P P A R と相互作用するポリペプチド、及び、b ) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される P P A R 蛋白質を発現している細胞。

【請求項 6】 転写因子が酵母の G A L 4 蛋白質である請求項 4 または 5 記載の細胞。

【請求項 7】 レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項 4 または 5 記載の細胞。

【請求項 8】 i ) 請求項 4 に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高い P P A R リガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、i i ) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な P P A R の転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質が P P A R を介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法。

【請求項 9】 i ) 請求項 4 に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高い P P A R リガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、i i ) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な P P A R の転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

【請求項 1 0】 インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項 9 記載のスクリーニング方法。

【請求項 1 1】 i ) 請求項 5 に記載の細胞、浮腫惹起効果の高い P P A R リガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、i i ) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な P P A R の転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被検物質が P P A R を介する浮腫惹起活性を促進するか否かを検出する方法。

【請求項 1 2】 i ) 請求項 5 に記載の細胞、浮腫惹起効果の高い P P A R リガンド、及び被検物質を接触させる工程、i i ) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な P P A R の転写活性誘導活性の変化を分析する工程、及び i i i ) レポーター活性を増大させない被検物質を選択する工程を含むことを特徴とする、浮腫惹起活性のない

インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

【請求項13】 インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項12記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、あるいは、

i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質を発現している細胞。

【請求項15】 i) 請求項14に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被検物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法。

【請求項16】 i) 請求項14に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法。

【請求項17】 インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項16記載のスクリーニング方法。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、該蛋白質を利用した副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法に関する。

【0002】

#### 【従来の技術】

インスリン抵抗性改善薬として効果が認められているチアゾリジン誘導体はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ (peroxisome proliferator activated receptor: PPAR $\gamma$ ) のアゴニストとして作用することが示されている (非特許文献1参照)。チアゾリジン誘導体のPPAR $\gamma$ との親和性は生体内の血糖降下作用と相関することから、該化合物群のインスリン抵抗性改善作用はPPAR $\gamma$ を介した作用であると考えられている (非特許文献2参照)。このためPPAR $\gamma$ のアゴニストの検出方法はインスリン抵抗性糖尿病治療薬をスクリーニングする有効な手法であると考えられてきた。

糖尿病は、膵臓から分泌されるインスリンの作用不足から引き起こされるが主に2つのタイプが存在する。1型糖尿病と呼ばれるものは膵臓の $\beta$ 細胞が破壊されて発病し、治療にはインスリンを必要とする。一方で2型糖尿病 (インスリン非依存型糖尿病) は遺伝的な要素に過食や運動不足、ストレスなど、身体に負担と

なる生活習慣が加わり発病する。日本人の糖尿病では1型はごくわずかで2型が大部分を占めており、2型糖尿病患者ではインスリンによる糖代謝促進が起こりにくいインスリン抵抗性が生じている。そのため糖尿病の治療薬には単純な血糖降下剤のみでなく、インスリン抵抗性改善により糖代謝を促進する2型糖尿病の治療を対象とした研究が進められてきた。

PPARは核内受容体スーパーファミリーに属し、リガンドの結合によって活性化される転写促進因子として標的遺伝子上流にある応答配列に結合し、その転写を誘導することが知られている（非特許文献3参照）。

PPARには3つのサブタイプの存在が知られており、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ と称する（非特許文献4-5参照）。更に、種々の化合物について、PPARのサブタイプの活性化やその血糖、あるいは脂質低下作用についての報告がなされている。例えば、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体はPPAR $\gamma$ のリガンドであり、血清中のトリグリセリドレベルを有意に低下させることが知られている（非特許文献6-9参照）。一方、古くから脂質低下薬として用いられているフィブレート系薬剤は、PPAR $\alpha$ のリガンド効果を有することが知られており、臨床では、強い血清トリアシルグリセロールレベルの低下が認められている（非特許文献10-11参照）。

PPAR $\gamma$ アゴニストは細胞の増殖を停止し、細胞分化を促進することが報告されている（非特許文献12参照）。PPAR $\gamma$ は特に脂肪組織で発現が認められ（非特許文献13-14参照）、ホモ欠損型マウスでは脂肪細胞の分化誘導が起こらない。またPPAR $\gamma$ のアゴニストとして作用するチアゾリジン誘導体の投与は大型脂肪細胞の減少と小型脂肪細胞の増加を引き起こす（非特許文献15参照）。以上の知見から、チアゾリジン誘導体がインスリン抵抗性を改善する機構はPPAR $\gamma$ アゴニストが急速に脂肪細胞の分化を促進する結果、インスリン抵抗性誘発原因物質であるTNF $\alpha$ の産生抑制、末梢組織でのグルコーストランスポーター発現の促進、遊離脂肪酸産生の抑制が起こり、結果、細胞内への糖取り込みが亢進して高血糖が改善されと考えられている。（非特許文献16参照）。

近年チアゾリジン誘導体を用いた臨床での知見から、PPAR $\gamma$ のアゴニスト作

用を持つ従来の合成リガンドは、インスリン抵抗性改善作用のみでなく、いずれも生体内の循環血漿量を増大させて浮腫を惹起することが報告された（非特許文献17-18参照）。このPPAR $\gamma$ の合成アゴニストによる浮腫の惹起は心肥大等をもたらす重篤な副作用であり、インスリン抵抗性改善という主作用との乖離が強く望まれている。しかしながら、これまでPPAR $\gamma$ とリガンドの複合体がどのようなシグナル経路を介して前述の脂肪細胞の分化・インスリン抵抗性改善と浮腫の惹起という異なる応答を誘導するのか、そこに至る分子メカニズムは解明されていない。

PPARの転写因子活性には他の核内受容体同様に転写共役因子群との相互作用が必要であり、PPARと相互作用する因子を同定しようとする試みがなされて来た。実際に、生化学的な手法により、既存の核内受容体相互作用因子とPPAR $\gamma$ との結合が調べられており、SRC-1（非特許文献19参照）、CBP/p300（非特許文献20参照）、DRIP205、TRAP220（非特許文献21参照）、SMRT（非特許文献22参照）、Gadd45（非特許文献23参照）、RIP140（非特許文献24参照）など複数の分子がPPAR $\gamma$ と相互作用することが報告されている。同じく生化学的な手法で、レチノイドXレセプター（RXR: retinoid X receptor）がPPARとリガンドの存在依存的にヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子上流の応答配列に結合することが報告されている（非特許文献25参照）。しかしながら、これらの共役因子群のアゴニスト依存性や、下流のシグナル経路にどのように関わるか、その詳細な機構は明らかでない。

一方、新規の核内受容体の相互作用因子を網羅的に探索する方法として、リガンドを介在させた、酵母ツーハイブリッドシステム（Yeast Two-hybrid system）（非特許文献26参照）を用いる手法が広く用いられてきたが、ことPPAR $\gamma$ に関してはこれまで酵母ツーハイブリッドシステムでリガンド依存的な結合因子を見つけることが困難であった。リガンドを介在させない酵母ツーハイブリッドシステムでPPAR $\gamma$ 結合因子を探索した結果では、PBP（非特許文献27参照）、PGC-1（非特許文献28参照）、PGC-2（非特許文献29参照）、SHP（非特許文献30参照）などのPPAR $\gamma$ 結合因子

が報告されているが、いずれの因子もリガンドの非存在下においても PPAR $\gamma$  と相互作用しており、明らかなリガンド依存性 PPAR $\gamma$  結合因子は得られてこなかった。また酵母ツーハイブリッドシステムで PPAR $\gamma$  と相互作用因子の結合におけるリガンド依存性を検出したとするわずかな報告例は、いずれも既存の核内受容体の相互作用因子を PPAR $\gamma$  とともに発現させた酵母を培養、濃縮して相互作用を検出したもので（特許文献 1 及び非特許文献 2 4 参照） cDNA ライブラリーから明らかなリガンド依存性を有する PPAR $\gamma$  の相互作用因子を、酵母ツーハイブリッドシステムでスクリーニングすることに成功した事例はなかった。例えば、上述の非特許文献 2 3、及び非特許文献 2 8 中に記載された相互作用因子は、PPAR $\gamma$  以外ではサブタイプの PPAR $\alpha$  を含めて核内受容体のリガンド依存性な相互作用が酵母ツーハイブリッドシステムで検出されているにもかかわらず、PPAR $\gamma$  に関しては生化学的手法でしかリガンド依存性が見られない。生化学的手法と酵母を用いる手法では感度、プローブ対相互作用因子の比率が異なるため、PPAR $\gamma$  リガンドの作用を酵母ツーハイブリッドシステムでは効率よく検出できないと説明されてきた（非特許文献 2 4 参照）。しかし生化学的な手法は 1 対の蛋白質間の相互作用を検出するのには適しているが、特定の蛋白質に相互作用する蛋白質を網羅的に検索することが困難である。一方酵母ツーハイブリッドシステムでは特定の蛋白質と相互作用する蛋白質をライブラリー中から検索することが可能である。

## 【 0 0 0 3 】

【特許文献 1】特開平 1 1 - 5 6 3 6 9 号公報

【非特許文献 1】J. Biol. Chem., 1995 年, 第 2 7 0 巻, p. 1 2 9 5 3 - 1 2 9 5 6

【非特許文献 2】Journal of Medicinal Chemistry, 1996 年, 第 3 9 巻, p. 6 6 5 - 6 6 8

【非特許文献 3】Cell, 1995 年, 第 8 3 巻, p. 8 3 5 - 8 3 9

【非特許文献 4】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 年, 第 9 1 巻, p. 7 3 5 5 - 7 3 5 9

【非特許文献 5】蛋白質・核酸・酵素, 1995 年, 第 4 0 巻, 第 1 3 号, p.

50-55

【非特許文献6】Diabetes, 1997年, 第46巻, p. 433-439

【非特許文献7】Diabetes Care, 1996年, 第19巻, 第2号, p. 151-156

【非特許文献8】Diabetes Care, 1992年, 第15巻, 第2号, p. 193-203

【非特許文献9】Diabetologia, 1996年, 第39巻, p. 701-709

【非特許文献10】Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997年, 第94巻, p. 4312-4317、

【非特許文献11】Drugs, 1990年, 第40巻, 第2号, p. 260-290

【非特許文献12】Jpn. J. Cancer Res., 1999年, 第90巻, p. 75

【非特許文献13】Genes and Development, 1994年, 第8巻, p. 1224-1234

【非特許文献14】Cell, 1994年, 第79巻, p. 1147-1156

【非特許文献15】Mol. Cell, 1999年, 第4巻, p. 597-609

【非特許文献16】J. Biol. Chem., 1995年, 第270巻, p. 12953

【非特許文献17】Diabetes Frontier, 1999年, 第10巻, p. 811-818

【非特許文献18】Diabetes Frontier, 1999年, 第10巻, p. 819-824

【非特許文献19】Gene Expr, 1996年, 第6巻, p. 185-195

【非特許文献20】J. Biol. Chem, 1999年, 第274巻, p. 7681-7688

【非特許文献21】Mol. Cell Biol, 2000年, 第20巻, p. 80

08-8017

【非特許文献22】Pro.Natl.Acad.Sci.USA,1998年,第95巻,p. 2920-2925

【非特許文献23】Biochem.Biophys.Res.Comm., 2000年,第272巻,第1号,p. 193-198

【非特許文献24】Mol Endocrinol. 1998年,第12巻,第6号,p. 864-881

【非特許文献25】Ann. Rev. Cell Dev. Biol.,1996年,第12巻,p. 335-363

【非特許文献26】Proc.Natl.Acad.Sci. USA,1991年,第88巻,p. 9578-9582

【非特許文献27】J.Biol.Chem,1999年,第274巻,p. 7681-7688

【非特許文献28】Cell,1998年,第92巻,p. 829-839

【非特許文献29】EMBO J.,1999年,第18巻,第13号,p. 3676-3687

【非特許文献30】Biochim Biophys Acta.,1997年,第1巻,第1350号,p. 27-32

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするのに有用なツールとなるリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、そして、該蛋白質を利用した副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を提供することにある。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、糖代謝改善作用（主作用）惹起効果の高いアゴニストの存在に依存してPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質群、および浮腫（副作用）惹起効果の高いア

ゴニストの存在に依存してPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質群を、酵母ツーハイブリッドシステムに活性の高いPPAR $\gamma$ アゴニストを高濃度で介在させる独自の手法により同定した。その結果、主作用アゴニストに依存してPPAR $\gamma$ に結合する分子として、ECH-1 (enoyl-CoA hydratase) 様蛋白質 (enoyl-CoA hydratase like protein: ECHLP) を、副作用アゴニストに依存してPPAR $\gamma$ に結合する分子として、ヒト抗オキシダント蛋白質2 (anti-oxidant protein 2 またはnon-selenium glutathione peroxidase, acidic calcium-independent phospholipase A2; Genebank アクセッション番号XM\_001415、以下AOP2と略記する) を見出した。さらに、細胞中でECHLPが過剰に発現するとリガンド依存的なPPAR $\gamma$ の転写誘導活性を顕著に抑制することを発見した。さらに同蛋白質は糖尿病モデルマウスにおいて血糖値の変動に関わらず発現量が亢進していることをジーンチップ法で見出し、同蛋白質が糖尿病態の原因因子であることを発見した。また、細胞中でAOP2が過剰に発現するとリガンド依存的なPPAR $\gamma$ の転写誘導活性を顕著に促進することを発見した。さらにAOP2は糖尿病モデルマウスにおいてその蛋白質量が増大していることを2次元電気泳動法で見出し、糖尿病態における同蛋白質の過剰な存在が、PPAR $\gamma$ を介して浮腫をもたらす特定の遺伝子群の発現を亢進させる可能性を見出した。

同様に上記の酵母ツーハイブリッドシステムに活性の高いPPAR $\gamma$ アゴニストを高濃度で介在させる独自の手法により、主作用アゴニストに依存してPPAR $\gamma$ に結合する分子として、FLJ13111 (アクセッション番号AK023173) を見出した。さらに細胞中でFLJ13111蛋白質が過剰に発現すると主作用アゴニストに依存してPPAR $\gamma$ の転写誘導活性が顕著に亢進することを見出した。

これらの知見をもとにして、PPARを介して主作用に特異的に寄与し、副作用を惹起しない物質を検出する新しいインスリン抵抗性改善薬の同定およびスクリーニング方法を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、

(1) 効果の高いPPARのリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、

(2) 糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、

(3) 浮腫惹起効果の高いPPARリガンド存在下で、バイト (b a i t) として配列番号2で表されるPPAR $\gamma$ 蛋白質の少なくとも第204番目から505番目を含む領域をコードするポリヌクレオチドを用い、プレイ (p r e y) としてcDNAライブラリーを用いる酵母ツーハイブリッドシステムを利用した、リガンド依存的にPPAR $\gamma$ と相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、

(4) i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び/または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARと相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ii) 配列番号2または配列番号6で表されるPPAR蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、iii) 前記転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、  
あるいは、

i) 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号4で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及

び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び i i) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 4 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質を発現している細胞、

(5) i) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、i i) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子の DNA 結合領域からなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、i i i) 該転写因子の DNA 結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、

あるいは、

i) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び i i) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、a) 配列番号 8 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 8 で表されるアミノ酸配列において、1～10 個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチド、及び、b) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質を発現している細胞、

(6) 転写因子が酵母の GAL 4 蛋白質である請求項 4 または 5 記載の細胞、

(7) レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である請求項4または5記載の細胞、

(8) i) 請求項4に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法、

(9) i) 請求項4に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(10) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項9記載のスクリーニング方法、

(11) i) 請求項5に記載の細胞、浮腫惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、被験物質がPPARを介する浮腫惹起活性を促進するか否かを検出する方法、

(12) i) 請求項5に記載の細胞、浮腫惹起効果の高いPPARリガンド、及び被検物質を接触させる工程、ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的なPPARの転写活性誘導活性の変化を分析する工程、及びiii) レポーター活性を増大させない被検物質を選択する工程を含むことを特徴とする、浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(13) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項12記載のスクリーニング方法

(14) i) 配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ

酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
 ii) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質の少なくともリガンド結合領域と転写因子の DNA 結合領域とからなる融合蛋白質をコードする遺伝子、及び、  
 iii) 前記転写因子の DNA 結合領域が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換された細胞、  
 あるいは、

i) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 17 で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び ii) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質が結合し得る応答配列に融合されたレポーター遺伝子により形質転換され、  
 a) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、あるいは配列番号 17 で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／または挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的に PPAR と相互作用するポリペプチド、  
 及び、  
 b) 配列番号 2 または配列番号 6 で表される PPAR 蛋白質を発現している細胞、

(15) i) 請求項 14 に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高い PPAR リガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、  
 ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な PPAR の転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、  
 被検物質が PPAR を介した糖代謝改善作用を促進するか否かを検出する方法、

(16) i) 請求項 14 に記載の細胞、糖代謝改善作用惹起効果の高い PPAR リガンド、及び被検物質を接触させる工程、及び、  
 ii) レポーター遺伝子の発現を指標として該リガンド依存的な相互作用の変化または該リガンド依存的な PPAR の転写活性誘導活性の変化を分析する工程を含むことを特徴とする、  
 インスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする方法、

(17) インスリン抵抗性改善薬が糖代謝改善剤である請求項16記載のスクリーニング方法に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明で使用される用語につき説明する。

本明細書中で使用される「主作用」は「糖代謝改善作用」を、「副作用」は「浮腫を惹起する作用」を表す。糖代謝改善作用とは、細胞内に血液中の糖（グルコース）を取り込んでエネルギーとして消費したり、グリコーゲンのようなエネルギー貯蔵物質として蓄積する機能を促進する作用をいう。浮腫を惹起する作用とは、細胞外液が間質に蓄積、貯留して浮腫（むくみ）を惹起させる効果をいう。「主作用リガンド」は「糖代謝改善作用（主作用）惹起効果の高いリガンド」を、「副作用リガンド」は「浮腫（副作用）惹起効果の高いリガンド」を表す。糖代謝改善作用惹起降下の高いリガンドとしては、実施例1における条件の下で、対照群に比較して血糖値を25%低下させるのに必要な化合物濃度が従来型のPPAR $\gamma$ リガンド（例えばピオグリタゾン）に比較して、5分の1から1000分の1の低濃度、より好ましくは、10分の1から10000分の1の低濃度であるものが好ましい。浮腫惹起効果の高いリガンドとしては、100mg/kgの化合物を投与したときに二週間で対照群に比較して125%以上200%以下の循環血漿量の増大をもたらすもの、あるいは従来型のPPAR $\gamma$ リガンド（例えばピオグリタゾン）に比較して15%以上100%以下の循環血漿量の増大をもたらすものが好ましい。「効果の高いPPARのリガンド」は、「糖代謝改善作用（主作用）惹起効果の高いリガンド」、「浮腫（副作用）惹起効果の高いリガンド」、または前記両効果の高いリガンドを表す。「試験用細胞」は「PPARとPPAR相互作用ECLPとのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」、「PPARとPPAR相互作用AOP2とのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」、または「PPARとPPAR相互作用FLJ13111とのリガンド依存的な相互作用をレポーター遺伝子の発現を指標として測定できる細胞」

を表す。「酵母ツーハイブリッドシステム」は、酵母の転写活性化因子にはDNA結合領域と転写活性化領域が存在し、転写活性化の開始には両者の相互作用が必要であることを利用し、①前記DNA結合領域に結合させた標的蛋白質と②前記転写活性化領域に結合させた蛋白質の相互作用を検出するシステムである。酵母ツーハイブリッドシステムにおいて、バイト (b a i t) はDNA結合領域に結合させた標的蛋白質を、プレイ (p r e y) は転写活性化領域に結合させた蛋白質を示す。「cDNAライブラリー」とは、細胞内で合成されている数万種類のmRNA (遺伝子情報の写しでタンパク質のアミノ酸配列を指令する) を抽出・分離し、逆転写酵素によりそのmRNAに相補なDNAを合成し、末端の加工をへてベクターへ組み込んだものである。本明細書において、「PPARリガンド結合領域」はPPARのリガンドが結合する領域であって、配列番号2記載のヒトPPAR $\gamma$ 2アミノ酸配列では第204番から第505番目までを含む領域、ヒトPPAR $\alpha$ アミノ酸配列では第167番から第468番目までを含む領域をそれぞれ示す。「DNA結合領域」は、DNAに結合するために機能する領域であり、応答配列に対するDNA結合能を有するが、単独で転写活性化能を有しないものを示す。GAL4転写因子のDNA結合領域は、N末端側 (およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域) に存在する。

【0008】

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書の試験用細胞作製のPPAR相互作用蛋白質遺伝子に含まれるポリヌクレオチドによりコードされるPPAR相互作用ポリペプチドには、

(1) 配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(2) 配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド (以下、機能的等価改変体と称する) ；及び

(3) 配列番号4、配列番号8または配列番号17で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、リガンド依存的にP

PARに結合する蛋白質であるポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）；

が含まれる。

機能的等価改変体としては、「配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列を含み、しかもリガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」、「配列番号4または配列番号17で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、主作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」あるいは「配列番号8で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、副作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であるポリペプチド」が好ましい。

相同ポリペプチドは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列からなり、しかも、リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質である限り、特に限定されるものではないが、配列番号4または配列番号17で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができ、好ましくは主作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質であり、配列番号8で表されるアミノ酸配列に関して、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなることができ、好ましくは副作用リガンド依存的にPPARに結合する蛋白質である。なお、本明細書における前記「相同性」とは、Clustal program (Higgins and Sharp, Gene 73, 237-244, 1998; Thompson et al. Nucleic Acid Res. 22, 4673-4680, 1994) 検索によりデフォルトで用意されているパラメータを用いて得られた値を意味する。前記のパラメータは以下のとおりである。

Pairwise Alignment Parametersとして

K tuple 1

Gap Penalty 3

Window 5

Diagonals Saved 5

以上、本明細書の試験用細胞に含まれるPPAR相互作用ポリペプチドについて説明したが、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用ECHLP」と称する。配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用AOP2」と称する。また、配列番号17で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、その機能的等価改変体、及びその相同ポリペプチドを総称して、以下、「PPAR相互作用FLJ13111」と称する。

また、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17記載のアミノ酸配列で示されるポリヌクレオチド、その機能的等価改変体、または、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列を含むポリヌクレオチドなら何れでもよい。好ましくは、配列番号4、配列番号8、または配列番号17記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号3、配列番号7、または配列番号16記載の塩基配列である。

## 【0009】

本発明の、副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングする為に有用なツールとなるリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、該蛋白質を利用した副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を以下に記載する。

## 【0010】

＜リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質のスクリーニング方法＞

本発明においては、PPAR $\gamma$ とリガンド依存的に相互作用する因子を酵母ツ－ハイブリッドシステムを利用したレポーター遺伝子の発現を指標としてcDNA

ライブラリー中から網羅的に同定することができる。本発明ではPPARとその転写共役因子のリガンド依存的な相互作用を検出し、PPAR自身の転写誘導能の検出を必要としないため、同転写誘導能発現に関与する哺乳動物固有の因子群の存在を要しない。従って試験用細胞として特に哺乳動物細胞を用いる必要がなく、真核細胞、例えば、酵母細胞、昆虫細胞及び哺乳動物細胞などでもよい。これらのうち、酵母細胞は培養が容易で迅速に実施できる上、外来遺伝子の導入など遺伝子組換え技術を適用するのが容易である。またPPARと相互作用因子との結合におけるリガンド依存性は同じ酵母ツーハイブリッドシステムを利用した方法で効率よく追試、検出することができる。

酵母ツーハイブリッドシステムは、レポーター遺伝子の発現をマーカーとして蛋白-蛋白質間相互作用を検出する方法である。一般に転写因子はDNA結合領域と転写活性化領域という機能の異なる2つの領域を有するが、ツーハイブリッドシステムでは、2種類の蛋白質XとYの相互作用を調べるために、転写因子のDNA結合領域とXからなる融合蛋白質、および、転写因子の転写活性化領域とYからなる融合蛋白質の2種類を同時に酵母細胞内で発現させる。蛋白質XとYが相互作用すると2種類の融合蛋白質が1つの転写複合体を形成し、これが細胞の核内において該転写因子の応答配列（特異的に結合するDNAの部位）と結合してその下流に配置されたレポーター遺伝子の転写を活性化する。このように2つの蛋白質の相互作用をレポーター遺伝子の発現に置き換えて検出することができる。

酵母ツーハイブリッドシステムは、通常、特定の蛋白質をプローブとしてこれと相互作用する未知蛋白質の遺伝子同定に用いられる。しかしながら核内受容体とその一部の転写共役因子群に見られるような、両者の結合が受容体リガンドの存在に依存して起こる場合には、リガンドを外部から添加したツーハイブリッドシステムを用いる必要がある。しかしながら、従来の技術の項で前述した通り、酵母ツーハイブリッドシステムではPPAR $\gamma$ と相互作用因子のリガンド依存性の検出が困難であり、リガンド依存性のPPAR $\gamma$ 相互作用因子の網羅的なスクリーニングは成功していなかった。この理由を本発明者らは、酵母の性質上PPAR $\gamma$ アゴニストの細胞内へ透過性が低く、リガンド依存性の検出感度が低い

めと予見し、報告された中で PPAR $\gamma$  アゴニストとして最も活性の高い化合物群を高濃度で酵母に作用させることにより、PPAR $\gamma$  と相互作用因子のリガンド依存性の検定やスクリーニングに適用できる酵母ツーハイブリッドシステムの独自の方法を完成した。より具体的には実施例 2 に記載の方法で本スクリーニングを実施できる。

PPAR $\gamma$  のリガンド依存的相互作用因子を検出し、該相互作用に対する被験物質の作用を測定することを特徴とする方法の別の実施態様としては、例えば、PPAR $\gamma$  と相互作用因子とのリガンド依存的結合を、生化学的に検出する方法がある。このような方法では、例えば RI など で標識した培養細胞の抽出液から、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、プロテイン A、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトースーバインディングプロテイン (MBP) など適当なタグ蛋白質と PPAR $\gamma$  のリガンド結合領域からなる融合タンパク質と結合する蛋白質を被験物質の存在下で直接的に検出し、該結合蛋白質を精製し、アミノ酸配列決定により同定することで実施できる。

#### 【0011】

<リガンド依存的に PPAR と相互作用する蛋白質を利用した、糖代謝改善作用の検出方法・インスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法；リガンド依存的に PPAR と相互作用する蛋白質を利用した、浮腫惹起活性の検出方法・浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法>

#### 1. PPAR 相互作用 ECHLP を利用した糖代謝改善作用の検出法・インスリン抵抗性改善薬スクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i) PPAR $\alpha$  または  $\gamma$  の少なくともリガンド結合領域と転写因子の DNA 結合領域の融合遺伝子、あるいは PPAR $\alpha$  または  $\gamma$  分子の全長域をコードする遺伝子、(ii) PPAR 相互作用 ECHLP をコードする遺伝子、及び (iii) 該転写因子の DNA 結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいは PPAR $\alpha$  または  $\gamma$  が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における、PPAR 相互作用 ECHLP による PPAR の転写活性化能抑制作用の被験物質による変化をレポーター遺

伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介する主作用を選択的に促進するか否かの検出方法が挙げられる。また、同検出方法により検出するレポーター活性を増大させる化合物を選択することにより、PPARを介する主作用を選択的に促進する化合物をスクリーニングする方法が挙げられる。

## 2. PPAR相互作用AOP2を利用した浮腫惹起活性の検出法・浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i) PPAR $\alpha$ または $\gamma$ の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域の融合遺伝子、あるいはPPAR $\alpha$ または $\gamma$ 分子の全長域のコード遺伝子(ii) PPAR相互作用AOP2のコード遺伝子、及び(iii) 該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいはPPAR $\alpha$ または $\gamma$ が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における、PPAR相互作用AOP2によるPPARの転写活性化能促進作用の被験物質による変化をレポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介する副作用を有する化合物を検出する方法、同レポーター系により、副作用と乖離した、主作用を選択的に促進する化合物を選択、スクリーニングする方法が挙げられる。

## 3. PPAR相互作用FLJ13111を利用した糖代謝改善作用の検出法・インスリン抵抗性改善薬スクリーニング法

本発明の一つの実施態様としては、(i) PPAR $\gamma$ の少なくともリガンド結合領域と転写因子のDNA結合領域の融合遺伝子、あるいはPPAR $\gamma$ 分子の全長域をコードする遺伝子、(ii) PPAR相互作用FLJ13111をコードする遺伝子、及び(iii) 該転写因子のDNA結合領域が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子、あるいはPPAR $\alpha$ または $\gamma$ が結合し得る応答配列に連結されたレポーター遺伝子で形質転換された試験用細胞を用い、これを被験物質と共存させ、試験用細胞における、PPAR相互作用FLJ13111によるPPARの転写活性化亢進作用の被験物質による変化をレポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することからなるPPARを介する主作用を選択的に促進するか否かの検出方法が挙げられる。また、同検出方法により検出する

レポーター活性を増大させる化合物を選択することにより、PPARを介する主作用を選択的に促進する化合物をスクリーニングする方法が挙げられる。

#### 【0012】

上記1、2、または3の実施態様において、PPARの転写誘導能を検出するために用いられる転写因子は、細胞核内で特定のDNA配列に結合する領域を有する真核生物の転写因子であれば限定されない。また転写因子のDNA結合領域は、応答配列に対するDNA結合能は有するが、単独で転写活性化能を有しないものであればよい。このような転写因子としては、例えば、酵母のGAL4蛋白質（Keeganら、Science、第231巻、第699-704頁、1986年、Maら、Cell、第48巻、第847-853頁、1987年）が挙げられる。GAL4転写因子のDNA結合領域および転写活性化領域は、例えばGAL4の場合、N末端側（およそ第1番目から147番目までのアミノ酸を含む領域）に存在する。

応答配列は、転写因子のDNA結合領域が結合し得るDNA配列を用いる。遺伝子の上流域からその領域を切り出して用いる、あるいはその配列を化学合成に合成して用いてもよい。

応答配列の下流に配置されるレポーター遺伝子は、一般に用いられるものであれば特に限定されないが、定量的測定が容易な酵素遺伝子などが好ましい。例えば、バクテリアトランスポゾン由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（CAT）、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子（Luc）、クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質遺伝子（GFP）等があげられる。レポーター遺伝子は、応答配列の下流に機能的に連結される、あるいはプロモーターに応答配列を挿入されているものが用いられる。

#### 【0013】

PPAR $\alpha$ または $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードするポリヌクレオチドは、既知のアミノ酸配列や塩基配列の情報などをもとに設計し合成したプライマーやプローブを用いて、PCR（Polymerase Chain Reaction）法やハイブリダーゼーションによるスクリー

ニングにより、cDNAライブラリーから単離できる。PPAR相互作用ECLPは、同じ分子種として同定されるもので、PPARとリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (LOC115289; GeneBank accession 番号XM\_008904、HPXEL; GeneBank accession 番号U16660、FitzPatrick DRら、Genomics 1995年27巻(3):457-466頁)、マウス (Ech1; GeneBank accession 番号NM\_016772)、ラット (HPXEL; GeneBank accession 番号NM\_022594、FitzPatrick DRら、Genomics 1995年27巻(3):457-466頁) などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR相互作用AOP2は、同じ分子種として同定されるもので、PPARとリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (AOP2/KIAA0106; GeneBank accession 番号XM\_001415、D14662)、マウス (AOP2/1-Cys Prx/ nonselenium glutathione peroxidase; GeneBank accession 番号AF004670、AF093852、Y12883)、ラット (AOX2; GeneBank accession 番号AF014009)、ウシ (GPX/ PHGPx; GeneBank accession 番号AF080228、AF090194) などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR相互作用FLJ13111は、同じ分子種として同定されるもので、PPARとリガンド依存的に相互作用して該受容体の転写誘導能に影響を与えるものであればいずれの種由来のものであってもよく、例えばヒト (FLJ13111; GeneBank accession 番号AK023173、NM\_025082)、マウス (ヒトFLJ13111様蛋白質; GeneBank accession 番号XM\_134598) などの哺乳動物由来のものが挙げられる。

PPAR $\gamma$ は、同じ分子種として同定されるもので、核内レセプターとしての生体内での機能を果たすものであればいずれの種由来のものであってもよく、例

えばヒト、マウス、ラットなどの哺乳動物由来のもの他、アフリカツメガエル由来のものなどが挙げられる。PPAR $\gamma$  (Dreyerら、Cell、第68巻、第879-887頁、1992年、Zhuら、Journal of Biological Chemistry、第268巻、第26817-26820頁、1993年、Kliwerら、Proc.Natl.Acad.Sci USA、第91巻、第7355-7359頁、1994年、Mukherjeeら、Journal of Biological Chemistry、第272巻、第8071-8076頁、1997年、Elbrechtら、Biochem.Biophys.Res.Comm., 第224巻、第431-437頁、1996年、Chemら、Biochem.Biophys.Res.Comm., 第196巻、第671-677頁、1993年、Tontonozaら、Genes & Development、第8巻、第1224-1234頁、1994年、Aperloら、Gene、第162巻、第297-302頁、1995年) の遺伝子配列およびアミノ酸配列はすでに報告されている。また、PPAR $\gamma$ には、PPAR $\gamma$ 1及びPPAR $\gamma$ 2の二種のアイソフォームが存在し、PPAR $\gamma$ 1はPPAR $\gamma$ 2と比較するとN末端側の30アミノ酸が欠失しているが、その他のアミノ酸配列は全く同じであり、いずれも脂肪組織に発現していることが知られている。

#### 【0014】

PPAR $\alpha$ 若しくは $\gamma$ 、転写因子のDNA結合領域、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111をコードするポリヌクレオチドは、例えば次のように得ることができるが、この方法に限らず公知の操作「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]でも得ることができる。

該蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば脂肪組織から該蛋白質をコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チ

オシアネート塩化セシウム法が挙げられる。PPAR $\alpha$ 若しくは $\gamma$ 、PPAR相互作用ECLP、PPAR相互作用AOP2、またはPPAR相互作用FLJ13111の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロッティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティング法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)、セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。

次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマー、例えばPPAR $\gamma$ には配列番号9と配列番号10、PPAR相互作用ECLPには配列番号12と配列番号13、PPAR相互作用AOP2には配列番号14と配列番号15、PPAR相互作用FLJ13111には配列番号18と配列番号19を用いてPCRに供し、目的とする遺伝子配列を増幅する。また、市販のcDNAライブラリーを用い、同様の目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする遺伝子配列を増幅することもできる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。具体的には実施例2, 4, 5, 7, 8, 10, 11記載の方法により得られる。

これまで述べた方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキサム・ギルバートの化学修飾法(Maxam, A. M. 及びGilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559, 1980)やジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. 及びVieira, J., Gene, 19, 269-276, 1982)等により行なうことができる。

【0015】

「Molecular Cloning」[Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年]に記載の方法により、これら各領域をコードするDNAを単独、あるいは連結し、適当なプロモーターの下流に連結することでPPAR $\alpha$ または $\gamma$ 及びPPAR相互作用ECHLPの試験細胞内での発現系、並びに、PPAR $\alpha$ または $\gamma$ 及びPPAR相互作用AOP2の試験細胞内での発現系が構築できる。同様にしてPPAR $\gamma$ 及びPPAR相互作用FLJ13111の試験細胞内での発現系が構築できる。

具体的には上述のように得られたポリヌクレオチドは、適当なベクタープラスミドに組み込み、プラスミドの形で宿主細胞に導入すればよい。これらは、両者が一つのプラスミド上に含まれるよう構成してもよく、あるいは各々別々のプラスミド上に含まれるよう構成してもよい。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

応答配列に連結されたレポーター遺伝子も、一般的な遺伝子組換え技術を用いて構築し、この構成をベクタープラスミド中に組込んだ上、得られた組換えプラスミドを宿主細胞中に導入したものを用いる。あるいは、このような構成が染色体DNAに組み込まれた細胞を取得してこれを用いてもよい。

PPARは外部から導入しても良いが、内在性のPPAR $\gamma$ が豊富に存在する脂肪由来細胞、あるいは腎由来細胞を宿主細胞として用いる場合は、上述の構成のうち、PPAR $\gamma$ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用ECHLPからなる構成のみ、PPAR $\gamma$ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用AOP2からなる構成のみ、あるいは、PPAR $\gamma$ を省いて、応答配列に連結されたレポーターとPPAR相互作用FLJ13111からなる構成のみ、を導入してもよい。

より具体的には、単離されたポリヌクレオチドを含む断片は、適当なベクタープラスミドに再び組込むことにより、真核生物及び原核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝

子を発現させることが可能である。

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株(Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpstein Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞(Invitrogen社製)等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではなく、PPAR相互作用ECLPによるPPAR $\alpha$ または $\gamma$ の転写誘導能阻害、PPAR相互作用AOP2によるPPAR $\alpha$ または $\gamma$ の転写誘導活性、あるいはPPAR相互作用FLJ13111によるPPAR $\gamma$ の転写誘導活性を検出できるものであればよい。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr(Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトのelongation factorプロモーターを有するpEF-BOS(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社製)等を例示できるが、これに限定されない。

#### 【0016】

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med. Immunol., 20, 27-

32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18, 5322)、pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature*, 329, 840-842) 等が挙げられる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman, H. and Magnusson, G. (1983) *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法(Graham, F. L. and van der Ed, A. J. (1973) *Virology*, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeringer Mannheim社製)を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.*, 1, 841-845)等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより該蛋白質群を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内に目的の蛋白質群が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(F

B S)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

【0017】

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR $\alpha$ または $\gamma$ の転写誘導能に対するPPAR相互作用ECLPの抑制作用が被験物質により阻害されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用ECLPあるいはPPARに作用し、その作用に依存してPPAR相互作用ECLPのPPAR転写誘導活性に対する抑制効果の減弱を生じるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質は、PPARの主作用促進剤として同定される。また、例えば②被験物質がPPARと結合して転写誘導能を促進し、一方でPPAR相互作用ECLPによる抑制効果を阻害するとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質はPPARの主作用特異的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用ECLPと結合してPPARの転写誘導能抑制効果を阻害するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用ECLPの発現を阻害したり分解を促進するとき、やはり発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質はPPARの主作用を促進するPPAR相互作用ECLP阻害剤として同定される。これら①、②及び③はいずれもPPARアゴニストがもたらす副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。より具体的には実施例5、9に記載の方法でインスリン抵抗性改善薬を同定・スクリーニングできる。例えば、実施例9に記載の条件で、IC50が10 $\mu$ M以下の物質を、好ましくは1 $\mu$ M以下の物質をインスリン抵抗性改善薬として選択することができる。

【0018】

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR $\alpha$ または $\gamma$ の転写誘導能に対するPPAR相互作用AOP2の促進作用が被験物質により抑制されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用AOP2あるいはPPAR $\gamma$ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用AOP2のPPAR $\gamma$ 転写誘導活性に対する促進効果の減弱を生じると

き、発現するレポーター活性の減少が観察される。このような被験物質は、PPAR $\gamma$ の副作用を抑制する物質として同定される。また、例えば②被験物質がPPAR $\gamma$ と結合して転写誘導能を促進し、一方でPPAR相互作用AOP2による促進効果を阻害するとき、発現するレポーター活性はPPAR相互作用AOP2を共発現させない状態と同じレベルにまで減少することが観察される。このような被験物質はPPAR $\gamma$ の、副作用と乖離した主作用選択的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用AOP2と結合してPPAR $\gamma$ の転写誘導能促進効果を阻害するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用AOP2の発現を阻害したり分解を促進するとき、やはり発現するレポーター活性の減少が観察される。このような物質はPPAR $\gamma$ の副作用を抑制するPPAR相互作用AOP2阻害剤として同定される。これらはいずれもPPAR $\gamma$ アゴニストがもたらす副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。一方で、例えば被験物質がPPAR相互作用AOP2あるいはPPAR $\gamma$ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用AOP2のPPAR $\gamma$ 転写誘導活性に対する促進効果を亢進させるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質はPPAR $\gamma$ の副作用を強く惹起する物質として同定されることから、レポーター活性を増大させない被験物質を選択することにより、浮腫惹起活性のないインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングすることができる。

#### 【0019】

試験用細胞を被験物質の存在下で培養し、PPAR $\gamma$ の転写誘導能に対するPPAR相互作用FLJ13111の促進作用が被験物質により亢進されることをレポーター遺伝子の発現により検出し測定することができる。①被験物質がPPAR相互作用FLJ13111あるいはPPAR $\gamma$ に作用し、その作用に依存してPPAR相互作用FLJ13111のPPAR $\gamma$ 転写誘導活性に対する促進効果の増強を生じるとき、発現するレポーター活性の増大が観察される。このような被験物質は、PPAR $\gamma$ の主作用促進剤として同定される。また、例えば②被験物質がPPARと結合して転写誘導能を促進し、かつPPAR相互作用FLJ13111による促進効果を増強するとき、発現するレポーター活性の増大が観察

される。このような被験物質はPPARの主作用特異的アゴニストとして同定される。また、例えば③被験物質がPPAR相互作用FLJ13111と結合してPPARの転写誘導能促進効果を増強するとき、あるいは被験物質がPPAR相互作用FLJ13111の発現を促進したり分解を抑制するとき、やはり発現するレポーター活性の増大が観察される。このような物質はPPARの主作用を促進するPPAR相互作用FLJ13111活性化剤として同定される。これら①、②及び③はいずれもPPARアゴニストがもたらす副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬として作用することが期待される。より具体的には実施例11、12に記載の方法でインスリン抵抗性改善薬を同定・スクリーニングできる。例えば、実施例12に記載の条件で、IC50が10  $\mu$ M以下の物質を、好ましくは1  $\mu$ M以下の物質をインスリン抵抗性改善薬として選択することができる。

#### 【0020】

本発明のスクリーニング法で使用する被検物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、市販の化合物（ペプチドを含む）、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, Tetrahedron, 51, 8135-73 (1995)）によって得られた化合物群、微生物の培養上清、植物や海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物、あるいは、本発明のスクリーニング法により選択された化合物（ペプチドを含む）を化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を挙げることができる。

#### 【0021】

##### 【実施例】

以下、実施例によって本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（「Molecular Cloning」 Sambrook, Jら、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年、等）に従って実施可能である。また、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って実施可能である。

## 【0022】

## ＜実施例1＞主作用リガンド・副作用リガンドの同定方法

PPAR $\gamma$ のアゴニストとして作用することが報告されている5種類のチアゾリジン誘導体、GW7282((S)-3-[4-[2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ]フェニル]-2-(1-ピロリル)プロピオン酸; GlaxoSmithKline, Drug Data Rep 2001; 23(9): 889)、GI-262570((S)-2-[(2-ベンゾイルフェニル)アミノ]-3-[4-[2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ]フェニル]プロピオン酸; GlaxoSmithKline, WO 0038811)、GL-100085(2-(3-(2-(5-メチル-2-フェニルオキサゾール-4-イル)エトキシ)フェニルメチルチオ)酢酸; 小野薬品工業、WO9946232)、ロジグリタゾン(Rosiglitazone、(±)-5-[4-[2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)アミノ]エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン マレエート; GlaxoSmithKline, WO 0147529)、ピオグリタゾン(pioglitazone、(+)-5-[4-[2-(5-エチル-2-ピリジニル)エトキシ]ベンジル]-2,4-チアゾリジンジオン; 武田薬品工業、JP 1986267580)の各化合物について作用メカニズムを解明するために、これらをそれぞれの化合物の特許明細書または文献報告の方法に従って合成し、それらの存在下における主作用および副作用を動物個体を用いてそれぞれ測定し、数値化した。なお、主作用の指標として血糖降下作用を、浮腫を惹起する作用の指標として循環血漿量の増加(荒川正昭、最新内科学大系 第三巻 主要症状-症候から診断へ- 260-266、1966; 金澤ら、Diabetes Frontier、第10巻、811-818頁、1999年; 岩本、Diabetes Frontier、第10巻、819-824頁、1999年)を測定した。

## 【0023】

## (1) 化合物群の血糖降下作用の測定

7-8週齢のKK/A $\gamma$ マウス(日本クレア社)に対し、0.5%メチルセルロース(MC)に懸濁後、濃度調整(1-10 mg/kg)した各化合物を1日1回

、4日間連続経口投与した。対照群には0.5% MCのみを投与した。最終投与16時間後にマウス尾静脈より採血を行い、血糖値をグルコースオキシダーゼ法を用いた市販キット（グルコースCIIテストワコー、和光純薬工業）により測定した。対照群の血糖値を100%とし、各化合物投与群における結果より、対照群の血糖値を25%低下をさせると推測される化合物濃度をED25として算出した（表1）。（Reginato MJら J Biol Chem 273巻49号32679頁 1998年 参照）

## （2） 化合物群の浮腫惹起活性の測定

基本的に、J. Appl. Physiol. 69(6): 2091-2096, 1990に示された方法に従って測定した。ラット（Sprague-Dawley rats; オス、3週齢）に、被験化合物を100 mg/kg (0.5% Methylcelluloseに懸濁)の用量で、一日一回で二週間連続経口投与した。エーテル麻酔下で下腿静脈より0.25%エバンスブルー（Evans Blue）溶液（生理食塩水）を0.25 ml (0.625 mg)/ラットで注入し、5分後、腹部下大静脈より採血した。血漿を水で希釈し、その吸光度(620 nm)から得られたエバンスブルー濃度(mg/ml)を注入量(0.625 mg)で割った値を血漿容量とした。さらに、血漿容量を体重で補正した値において、対照群（vehicle投与群）に対する量（%）を算出した（表1）。

これらの結果、GW7282は主作用・副作用ともに強く惹起した。一方GI-262570は主作用の惹起は比較的高い値を示すが、副作用は弱い。またGL-100085は主作用の惹起は弱い、副作用を強く惹起した。

【表1】 PPAR $\gamma$ アゴニストの血糖低下作用と循環血漿量増加作用

	血糖降下試験 ED <sub>25</sub> (mg/kg)	循環血漿量 % of CTRL
GW-7282	0.41	130
GI-262570	0.98	124
GL-100085	17	133
ピオグリタゾン	10	110
ロジグリタゾン	4.6	114

【0024】

<実施例2>PPAR $\gamma$ とリガンド依存的に相互作用する蛋白質の同定(1) PPAR $\gamma$ 遺伝子の単離

PPAR $\gamma$ のDNA結合領域およびリガンド結合領域を含むC末端側302アミノ酸をコードするcDNAを、ヒト脂肪組織由来のcDNAライブラリー(クロンテック社; Marathon Ready<sup>TM</sup> cDNA)からポリメラーゼ・チェーン・リアクション法(PCR法)によって取得した。遺伝子データベースGenebankのアクセッション番号U79012に記載されたヒトPPAR $\gamma$ 2の遺伝子配列を元に、酵母ツーハイブリッド用発現ベクターpDBtrp(インビトロジェン社、選択マーカーとしてTRP1遺伝子を有する)に挿入するため、同ベクターのマルチクローニングサイトの前後40ヌクレオチドとの相同領域を付加し、さらに挿入されたPPAR $\gamma$ の遺伝子断片の両側にそれぞれ制限酵素Kpn IとSma Iの認識サイトが形成されるように配列番号9及び10に示したプライマーを設計した。PCRはDNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)/55℃(30秒) 72℃(3分)のサイクルを35回、繰り返した。その結果得られた1004塩基対のDNA断片はPPAR $\gamma$ 2の第204アミノ酸から終止コドン直前までの302アミノ酸からなるPPAR $\gamma$ のコード領域を有している。

## (2) 酵母ツーハイブリッド用発現プラスミドの作製

制限酵素Sal IおよびNco Iで切断して直鎖上にしたベクターpDBtrp及び(1)で得られたPPAR $\gamma$ のcDNAを含むPCR断片を同時にツーハイブリッド用酵母株MaV203(インビトロジェン社)へ添加し、リチウム酢酸法により形質転換した(C Guthrie, R Fink Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic, San Diego, 1991年)。その結果同酵母細胞内で相同組換えが生じ、pDBtrpのマルチクローニングサイトにPPAR $\gamma$  cDNAが挿入されたプラスミド(以下pDB-PPAR $\gamma$ と略称する)が形成された。同プラスミドを有する酵母細胞を、プラスミドの選択マーカーであるトリプ

トファンを欠乏させた固形合成最小培地 (D I F C O 社) (20%アガロース) 上にて培養することにより選択し、同酵母細胞をザイモリエース (生化学工業) で室温にて30分処理した後、アルカリ法 (「M o l e c u l a r C l o n i n g」S a m b r o o k, J ら, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s, 1989年) でプラスミドを単離精製し、シーケンシングキット (アプライドバイオシステム社) およびシーケンサー (A B I 3700 DNA s e q u e n c e r アプライドバイオシステムズ社) を用いて塩基配列の決定を行い、P P A R  $\gamma$  の cDNA が p D B t r p の G A L 4 の D N A 結合領域のコード領域と翻訳のフレームが一致して挿入されているものを選択した。

### (3) 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

上述の p D B - P P A R  $\gamma$  により形質転換したツーハイブリッド用酵母株 M a V 203 を 400 ml の Y P D 液体培地 (D I F C O 社) に懸濁し、波長 590 ナノメートルの吸光度が 0.1 から 0.4 になるまで 30℃ で約 6 時間振とう培養した後、リチウム酢酸法でコンピテントセルとし、最終量を 1.0 ml の 0.1 M リチウムートリス緩衝液に懸濁した。同細胞をヒト腎臓 cDNA ライブラリー、ヒト肝臓ライブラリー、またはヒト骨格筋ライブラリー (いずれもクロンテック社 M a t c h M a k e r cDNA l i b r a r y) 各 20  $\mu$ g で形質転換し、同細胞を p D B - P P A R  $\gamma$  およびライブラリーそれぞれのプラスミドの選択マーカーであるトリプトファン、ロイシンを欠乏させた固形合成最小培地 (D I F C O 社) (20%アガロース) 上にて培養することにより選別し、両プラスミドが導入された形質転換株を得た。同時に同じ形質転換細胞をトリプトファン、ロイシンのほかに、ツーハイブリッドシステムにおいて人工的に発現させた G A L 4 D N A 結合領域の融合蛋白質に、G A L 4 転写促進領域の融合蛋白質が結合した場合に発現するレポーター遺伝子 H I S 3 が作動した細胞を選択するため、ヒスチジンを培地から除き、さらに H I S 3 がコードする酵素の阻害剤である 3 A T (3-AMINO-1, 2, 4-TRIAZOLE; シグマ社) 20 mM を添加した固形最小培地 (20%アガロース) 上で 30℃ で 5 日間培養した。同培地中には主作用・副作用ともに強く惹起する P P A R  $\gamma$  のアゴニスト G W

7282を最終濃度1.5  $\mu$ M添加しておき、同アゴニストの存在下でPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現していることを示す3AT耐性の酵母のコロニーを取得した。これらの酵母細胞を24時間YPD固形培地上で上述のアゴニストGW7282を15  $\mu$ Mの濃度で添加、あるいは非添加の状態で成長させた後、HIS3とは別のツーハイブリッドシステムの結合指示レポーターであるlacZ遺伝子の発現を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として調べた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は培地上の酵母細胞をニトロセルロースフィルターに移し取り、液体窒素に付けて凍結させた後、室温で解凍し、フィルターを0.4%のX-GAL(シグマ社)溶液を浸した濾紙上にのせて37℃で24時間静置し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ青色変化を測定した。フィルター上に写し取った細胞内容物が白色から青色に変化したコロニーを選択することにより、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からクロンテック社Yeast Protocols Handbookの方法に従ってライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を、配列番号11で表される塩基配列(GAL4AD領域に結合する配列; GeneBankアクセッション番号 U29899 Cloning vector pACT2 由来)をプライマーとし、シーケンシングキット(アプライドバイオシステム社)およびシーケンサー(ABI 3700 DNA sequencer アプライドバイオシステムズ社)を用いて決定した結果、上述3種類のいずれのライブラリーからも配列番号3に記載のECHLPの部分配列を含むクローンが含まれていることをBLAST(NCBI)によるホモロジー検索により確認した。また腎臓由来ライブラリーからは核内受容体の転写共役因子として知られているSRC-1(Smith CLらProc Natl Acad Sci U S A 20巻93(17)号8884-8888頁 1996年:), NcoR(Nagy LらCell; 89巻3号373-380頁 1997年)の遺伝子断片を含むクローンが含まれており、上記のスクリーニングでリガンド依存性のPPAR $\gamma$ の共役因子が取得できることが確認された。

また、同様の酵母ツーハイブリッドスクリーニングを以下の条件のもとで行った。ライブラリーとしてはヒト腎臓cDNAライブラリーで形質転換した細胞を用

いた。GW7282は最終濃度1  $\mu$ Mとなるように添加し、同アゴニスト存在下でPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を24時間YPD固形培地上でGW7282を10  $\mu$ Mの濃度で添加した状態で成長させた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定により、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、配列番号7に記載のAOP2 (Genebank アクセス番号 XM\_001415) の部分配列を含む独立したクローン2個が含まれていた。また核内受容体の転写共役因子として知られているSRC-1 (Smith CLら Proc Natl Acad Sci U S A 20巻93(17)号8884-8888頁 1996年), NcoR (Nagy Lら Cell ; 89巻3号373-380頁 1997年) の遺伝子断片を含むクローンが含まれており、上記のスクリーニングでリガンド依存性のPPAR $\gamma$ の転写共役因子を取得できることが確認された。

また、同様の酵母ツーハイブリッドスクリーニングを以下の条件のもとで行った。ライブラリーとしてヒト肝臓cDNAライブラリーで形質転換した細胞を用いた。GW7282は最終濃度1  $\mu$ Mとなるように添加し、同アゴニスト存在下でPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を24時間YPD固形培地上でGW7282を10  $\mu$ Mの濃度で添加した状態で成長させた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定により、上述のアゴニストの存在に依存してPPAR $\gamma$ に結合する蛋白質を発現している酵母細胞を複数特定し、同細胞からライブラリー由来のプラスミドを抽出した。そこに含まれる遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、配列番号16に記載の新規遺伝子 (FLJ13111類似遺伝子; Genebank アクセス番号AK023173の1塩基置換体) の部分配列を含むクローンが含まれていた。

【0025】

<実施例3> PPAR $\gamma$ とECHLPまたはAOP2のリガンド選択的相互作用の検出

実施例2で得たECHLP、AOP2をはじめとする蛋白質群とPPAR $\gamma$ の相

相互作用に対するアゴニストの依存性を、上述の主作用・副作用に対する効果が異なる2種のアゴニストGI-262570（最終濃度5  $\mu$ M、又は0.5  $\mu$ M）とGL-100085（最終濃度5  $\mu$ M、又は0.5  $\mu$ M）を用いて、酵母ツーハイブリッドシステムの $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標として測定した（図1；矢尻は黒が主作用選択的な化合物、縞が副作用選択的な化合物の濃度差により相互作用が大きく変化するものをそれぞれ示す。白の矢尻は主・副作用いずれに選択的な化合物でも濃度差による相互作用の変化が大きいものを示す。）。用いたアゴニスト以外の方法の詳細は実施例2と同様である。その結果、主作用に高い効果を持つ化合物GI-262570は、濃度を5  $\mu$ Mから0.5  $\mu$ Mに減じても同様にPPAR $\gamma$ とECHLPの結合を誘導したが（図1b）、副作用に比較的高い効果を持つ化合物GL-100085では濃度を5  $\mu$ Mから0.5  $\mu$ Mに減じるとPPAR $\gamma$ とECHLPの結合は大きく減退した（図1c）。一方、副作用に比較的高い効果を持つ化合物GL-100085は、濃度を5  $\mu$ Mから0.5  $\mu$ Mに減じても同様にPPAR $\gamma$ とAOP2の結合を誘導し（図1c）、主作用に高い効果を持つ化合物GI-262570添加では濃度を5  $\mu$ Mから0.5  $\mu$ Mに減じるとPPAR $\gamma$ とAOP2の結合は大きく減弱した（図1b）。これらは、アゴニストGI-262570、GL-100085の存在によってPPAR $\gamma$ とECHLP、あるいはPPAR $\gamma$ とAOP2のリガンド依存的相互作用がおこったことによると考えられ、この結果から、ECHLPはPPAR $\gamma$ と主作用に高い効果を持つアゴニストにより高い感度で相互作用することが明らかとなった。一方AOP2は副作用に高い効果を持つアゴニストにより高い感度で相互作用することが明らかとなった（図1c）。これらの結果はアゴニストの主作用、副作用に相関してアゴニスト依存的にPPAR $\gamma$ に相互作用する共役因子があることを示唆している。ECHLPは主作用の強く現れるアゴニストに、より選択的に応答して相互作用しており、このPPAR $\gamma$ とECHLPのリガンド依存的相互作用を利用することで主作用に高い効果をもつアゴニストを選択的に検出できるものと考えられた。一方クローン#1, 4, 5, 6, 7およびNCORはアゴニストGI-262570、GL-100085いずれの濃度減少でもPPAR $\gamma$ との結合が減弱し、アゴニストの主作用-副作用に相関が見られな

った。

【0026】

<実施例4>正常および糖尿病モデルマウスにおけるECHLP発現量の測定  
 上述の知見に基づき、ECHLPとPPAR $\gamma$ の相互作用がPPAR $\gamma$ アゴニストを介した主作用である糖代謝改善に関わることが予想された。そこで2種類の糖尿病モデルマウスKKAY/Ta (Iwatsukara, Endocrinol. Japon., 第17巻、第23-35頁、1970年、Taketomiら, Horm. Metab. Res., 第7巻、第242-246頁、1975年)、C57BL/KsJ-db/db (Chenら, Cell, 第84巻、第491-495頁、1996年、Leeら, Nature, 第379巻、第632-635頁、1996年、Kakura, Diabetologia, 第32巻、第636-643頁、1989年)の骨格筋、脂肪におけるECHLP遺伝子のマウスオルソログech1遺伝子のメッセンジャーRNA (mRNA) 発現量を遺伝子チップ (アフィメトリクス社) を用いて測定し (de Saizieuら, Nature Biotechnology, 第16巻、第45-48頁、1998年、Wodickaら, Nature Biotechnology, 第15巻、第1359-1367頁、1997年、Lockhartら, Nature Biotechnology, 第14巻、第1675-1680頁、1996年)、正常個体C57BL/6J、C57BL/KsJ-+m/+mのそれと比較することにした。

(1) マウスの組織の摘出：日本クレア社よりオスのC57BL/6J、KKAY/Ta、C57BL/KsJ-+m/+m及びC57BL/KsJ-db/dbマウスを各8匹購入した。C57BL/6Jは普通食で15週令になるまで集団飼育した。KKAY/Taマウスは高カロリー食(CMF, Oriental Yeast Co., Ltd.)で15週令になるまで単独飼育した。C57BL/KsJ-+m/+mマウス及びC57BL/KsJ-db/dbマウスは普通食で12週令になるまで集団飼育した。KKAY/TaマウスおよびC57BL/KsJ-db/dbマウスが正常マウスと比較して高血糖、高体重になっていることを確認した (KKAY/Taマウス：血糖値 $514.2 \pm 18.2$  mg/dl、体重 $49.9 \pm 0.7$  g

、C57BL/KsJ-db/dbマウス：血糖値 $423.7 \pm 14.1$  mg/dl、体重 $48.6 \pm 0.5$  g)。血糖値はマウス尾静脈より採血を行い、血糖値をグルコースオキシダーゼ法を用いた市販キット（オートバックA・グルコース試薬、ベーリンガー・マンハイム社）により測定した。これらの4種類のマウスをジエチルエーテルで麻酔し、副睾丸脂肪とひふく筋を摘出した。摘出直後に液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

(2) mRNAの抽出：組織は凍結プレス破碎装置CRYO-PRESS CP-100（マイクロテック・ニチオン社）を用いて破碎した。RNA抽出用試薬ISOGEN（ニッポンジーン社）を加え、ホモジナイザーULTRA-TURRAX T-8（IKA LABORTECHNIK社）を用いてホモジネートした。メーカー添付のプロトコールに従い、これらのサンプルからRNAを抽出した。これをDNase（ニッポンジーン社）で処理し、混入しているDNAを分解した。その後、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、RNAse-free  $\text{H}_2\text{O}$ に溶解した。RNA調製試薬QuickPrep Micro mRNA Purification kit（アマシャム社）を用いて添付プロトコールに従いmRNAを抽出した。

(3) ラベル化cRNAの調製：アフィメトリクス社のプロトコール（GeneChip Expression Analysis Technical Manual）に従って、mRNAから第1ストランドcDNA合成、第2ストランドcDNA合成、ビオチンラベル化cRNAの合成、ラベル化cRNAのフラグメント化を行った。

(4) ハイブリダイゼーション：アフィメトリクス社のDNAアレイ（GeneChip U74）は3枚のサブアレイA、B、Cからなっている。アフィメトリクス社の上記プロトコールに従って、DNAアレイにラベル化cRNAをハイブリダイズした後、洗浄し、各プローブの蛍光強度を測定した。

(5) アレイ間の測定値の補正：測定値については、サンプル間の補正を行った後、サブアレイ間の補正を行った。サンプル間の補正は、特定のサブアレイ上の遺伝子の蛍光強度の合計値をサンプル間で求め、最も高い蛍光強度の合計値を示したアレイと等しくなるようにその他のアレイの各遺伝子の測定値にアレイご

とに一定の倍率をかけた。サブアレイ間の補正は、サブアレイごとにAFFXプロブの蛍光強度の平均値を求め、サブアレイA、B、Cでそれらの平均値が同じになるようにサブアレイごとに各遺伝子の測定値に一定の倍率をかけた。

その結果KKAY/Taマウスでは、発症が進行していない5週齢の個体、あるいは正常個体と比較して病態発症が顕著な15週齢の個体ではech1 mRNAの発現量が2倍以上に増大していることが確認された(図2)。同様にdb/dbマウスでも正常個体と比較してech1発現量が2倍以上に増大していた。また15週齢のKKAY/Taマウスにおけるech1発現量の亢進は腎尿細管糖輸送における再吸収阻害剤として知られるフロリジン(phlorizin)を100 mg/kgの用量で30分おきに3回、腹腔内投与し、血糖値が短期的に正常レベルになった最初の投与から7時間後の組織でも変化がないことから、ech1は、糖尿病態の結果、血糖値の変動に起因して発現が亢進するのではなく、その発現の亢進が糖尿病態を特徴付ける原因因子の一つであると考えられた。

上述と同じ遺伝子チップを用いて12週令、オスの正常マウスC57BL/6J個体の臓器毎にech1のmRNA発現量を測定した結果、ech1は主要臓器のうちPPAR $\gamma$ の作用がある脂肪・筋肉・肝臓・腎臓と、ほかに心臓・肺での発現が顕著であった(図3)。これにより発現部位からもECHLP/Ech1がPPAR $\gamma$ の共役因子であることが裏付けられた。

【0027】

<実施例5>PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するECHLPの調節作用の検出

上述の結果から、ECHLPはPPAR $\gamma$ とリガンドを介して相互作用し、主作用(糖代謝改善)に関わること、さらにその発現亢進が糖尿病の病態と関連することが示された。そこでECHLPがPPAR $\gamma$ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドGAL-PPAR $\gamma$ の作製

ヒトPPAR $\gamma$ 2のリガンド結合領域をコードするcDNAを酵母Gal4のDNA結合領域(1-147アミノ酸)のC末端側に融合したキメラ蛋白質をコー

ドする遺伝子を動物細胞発現ベクターpZeoS<sub>V</sub> (インビトロジェン社) のマルチクローニングサイトに組み込んだ発現プラスミドGAL-PPAR<sub>γ</sub>を作製した。まずプラスミドpGBT9 (クロンテック社) からGal4のDNA結合領域をコードする遺伝子断片を制限酵素Hind III、Sma Iを用いて切り出し、これをpZeoS<sub>V</sub>のマルチクローニングサイトのサイトに挿入した (以下pZeo-DBと略記する)。次に前述のプラスミドpDB-PPAR<sub>γ</sub>からPPAR<sub>γ</sub>のリガンド結合領域をコードするDNA断片をKpn I、Sma Iを用いて切り出し、これをpZeo-DBのマルチクローニングサイトにあるKpn I、Pvu IIサイトの間に組み込み、動物細胞発現用プラスミドGAL-PPAR<sub>γ</sub>を作製した。

## (2) 動物細胞発現用プラスミドpcDNA-ECHLPの作製

配列番号12及び13に示したプライマーを用いて、ヒト骨格筋cDNAライブラリー (クロンテック社) からPCR法によりECHLPの全長域をコードする987bp (ベースペア) を含むcDNA断片を取得した。PCRはDNAポリメラーゼ (Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社) を用い、98℃ (1分) の後、98℃ (5秒) / 55℃ (30秒) 72℃ (3分) のサイクルを35回、繰り返した。これをpcDNA3.1/V5-HIS-TOPOベクター (インビトロジェン社) にin vitro 組換えによるTOPOクローニング法 (インビトロジェン社) により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-ECHLPを作製した。なおECHLPには終止コドン挿入せず、C末端側にベクター由来のV5エピトープおよびHIS6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

## (3) PPAR<sub>γ</sub>のリガンド依存的転写誘導能に対するECHLPの調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は6ウェル培養プレート (ウェル直径35mm) の培養皿に各ウェル2mlの10%牛胎児血清 (シグマ社) を含む最少必須培地DMEM (ギブコ社) を加えて70%コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法 (Graham Lら Virology, 52巻456頁1973年、新井直子、遺伝子導入と発現/解析法13-15頁1994年

)により、上述のGAL-PPAR $\gamma$  (0.15  $\mu$ g/ウェル)、およびGAL  
 4結合配列を8個繰り返ルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーターコ  
 ンストラクト (RE $\times$ 8-Luci, ; 下川ら、国際公開番号WO99/0481  
 5) (0.8  $\mu$ g/ウェル) をpCDNA-ECHLP (0.05-0.2  $\mu$ g/ウ  
 エル) とともに一過性にコトランスフェクトした。PPAR $\gamma$ アゴニスト2  $\mu$ M  
 あるいは被験化合物を培地に添加して48時間培養した後、培地を除去し、細胞  
 をリン酸緩衝液 (以下PBSと略称する) で洗浄した後にウェルあたり0.4 m  
 lの細胞溶解液 (100 mM リン酸カリウム (pH 7.8)、0.2%トリトン  
 X-100) を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液100  $\mu$ lにルシフェ  
 ラーゼ基質溶液100  $\mu$ l (ピッカジーン社) を添加し、AB-2100型 化学  
 発光測定装置 (アトー社) を用いて10秒間の発光量を測定した。ルシフェラー  
 ゼレポーター遺伝子と同時に $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミド  
 pCH110 (アマシャムファルマシアバイオテック社) 0.4  $\mu$ g/ウェルを細  
 胞にコトランスフェクトし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出キットGalact  
 o-Light Plus<sup>TM</sup> system (アプライドバイオシステム社) を用  
 いて $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定・数値化した。これを導入遺伝子のラン  
 スフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。  
 上記実験の結果、PPAR $\gamma$ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトラ  
 ンスフェクトしたECHLP発現プラスミドの用量に依存して著しい阻害が認め  
 られた (図4)。これによりPPAR $\gamma$ とECHLPのリガンド依存的な相互作用  
 がおこると、PPAR $\gamma$ の転写誘導活性が抑制されることが明らかになった。  
 この事実は、前述の糖尿病モデルマウスにおいて、過剰なECHLP/Ech1  
 が病態の原因因子であることを示した結果とよく一致する。すなわち、糖尿病の  
 病態ではECHLP/Ech1の過剰発現が生じたことによってPPAR $\gamma$ 転写  
 誘導活性の抑制が起こり、その結果PPAR $\gamma$ によって誘導されるべき下流遺伝  
 子の発現が十分でないために糖代謝が阻害されと考えられた。

ECHLP/Ech1は分子内に脂肪酸代謝に働くエノイルCoA加水酵素 (e  
 noyl-CoA hydratase) とジエノイルCoA異性化酵素 (die  
 noyl-CoA isomerase) の2種類の酵素活性領域と予想される構

造を有する (Filippula Aら J Biol Chem 273巻1号:349-355頁1998年)。また脂肪酸代謝酵素の阻害剤は糖尿病体マウスにおいて血糖値を降下させることが以前から知られていた (Collier Rら Horm Metab Res 25巻1号:9-12頁1993年)。この事実と、ECHLPがPPAR $\gamma$ 活性の抑制作用をもつという上述の知見から、ECHLPは過剰に存在するとPPAR $\gamma$ を介する糖代謝を抑えて自らの脂肪酸代謝酵素活性により脂質からのエネルギー生成を促進し、減少するとPPAR $\gamma$ 活性を解除して糖代謝へ生体のエネルギー源をシフトさせる、糖・脂肪代謝の拮抗的な調節を担う分子であると考えられた。これを利用して、PPAR相互作用ECHLPの量を減じれば、あるいは相互作用ECHLPによるPPAR $\gamma$ に対する抑制作用を阻害すれば、生体のエネルギー源を糖代謝へ向かわせ血糖値を降下させることが可能である。同時にECHLPを用い、そのような作用を持つ化合物を容易に選択することが可能である。

【0028】

<実施例6>正常および糖尿病モデルマウスにおけるAOP2蛋白量の比較

上述の知見に基づき、AOP2とPPAR $\gamma$ の相互作用がPPAR $\gamma$ アゴニストを介した副作用である浮腫の惹起に関わることが予想された。そこで糖尿病モデルマウスKKAY/Ta (Iwatsukaら、Endocrinol. Japon., 第17巻、第23-35頁、1970年、Taketomiら、Horm. Metab. Res., 第7巻、第242-246頁、1975年)と正常個体C57BL/6Jの脂肪に含まれる蛋白質含量を蛍光標識2次元ディファレンス電気泳動法 (・nl・ら、Electrophoresis 第18巻、第2071-2077頁、1997年、Tongera、Proteomics、第1巻、第377-396頁、2001年)を用いて比較した。病態モデルマウスにおいて蛋白質含量に2倍以上の差異が認められる蛋白質群について、質量分析法を用いて各蛋白質を同定した。

(1) マウスの組織の摘出

日本クレアよりオスのC57BL/6J、KKAY/Taマウスを購入した。C57BL/6Jは普通食で12週令になるまで集団飼育した。KKAY/Taマウス

は高カロリー食(CMF, オリエンタルイースト社)で12週令になるまで単独飼育した。KKA<sup>y</sup>/Taマウスが正常マウスと比較して高血糖、高体重になっていることを確認した(KKA<sup>y</sup>/Taマウス: 血糖値 $514.2 \pm 18.2$  mg/dl、体重 $49.9 \pm 0.7$  g)後、これら2種類のマウスをジエチルエーテルで麻酔し、副睾丸脂肪を摘出した。摘出直後に液体窒素で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## (2) 蛋白質試料の調製

凍結した副睾丸脂肪をウレア、両性界面活性剤を含むトリス緩衝液中でホモジナイザーULTRA-TURRAX T-8 (IKA LABORTECHNIK社)を用いてホモジネートした。メーカー添付のプロトコールに従い、これらのサンプルから遠心分離操作により上清を得て以下の二次元電気泳動用の試料とした。

## (3) 二次元電気泳動

アマシャムファルマシアバイオテックのプロトコールに従った。それぞれの試料に対して波長280ナノメートルの吸光度を測定することにより含有蛋白質量を決定し、それらから約 $50 \mu\text{g}$ の蛋白質を含む量を取り、それぞれ異なる蛍光色素(Cy3およびCy5、アマシャムファルマシアバイオテック社)による標識を行った後に混合し、IPGストリップ(アマシャムファルマシアバイオテック社)を用いて一次元目の等電点電気泳動を行った。二次元目の電気泳動の前に、IPGストリップをウレア、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセロール、ジチオスレイトールを含むトリス緩衝液で平衡化し、さらにヨードアセトアミドを溶解したウレア、ドデシル硫酸ナトリウム、グリセロール、ジチオスレイトールを含むトリス緩衝液で平衡化した。二次元目の電気泳動はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動を用いて行った。二次元電気泳動が終了したゲルを蛍光イメージ解析装置(アマシャムファルマシアバイオテック社)を用いて、それぞれの蛍光色素に特異的な励起・検出波長を使用して、それぞれの二次元電気泳動像を得た。それら二つの泳動像を解析ソフトウェア(アマシャムファルマシアバイオテック社)を用いて定量化し、病態モデル動物において蛋白質含量に2倍以上の差異が認められるスポットを特定し、スポットピッキング装置(アマシャムファルマシアバイオテック社)により切り出し、トリプシンを用いてゲル内酵素消化法(Sc h

evchenkoら、Analytical Chemistry、第68巻、第850-858頁、1996年)によりタンパク質を断片化し、ペプチド混合物をゲルより回収した。

#### (4) マススペクトル法による蛋白質の同定

得られたペプチド混合物をキャピラリー逆相液体クロマトグラフィーカラム(直径0.075 mm、長さ150 mm、エルシーパッキング社)を用い、0.2%ギ酸存在下、流速を毎分約200 nLに設定し、アセトニトリル勾配溶出法にて各ペプチドを分離した。液体クロマトグラフ装置(マイクローム・バイオリソース社)に直接接続したエレクトロスプレーイオン源を有する四重極イオントラップ型質量分析装置(サーモクエスト社)により、自動的に各ペプチドの分子イオンを選択しそのプロダクトイオンスペクトルを測定する方法を用いて各ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを得た。

KKAY/Taマウスの副睾丸脂肪において正常個体と比較して2倍の含量増加を確認した蛋白質の断片ペプチドの個々のプロダクトイオンスペクトルを、公共の蛋白質データベースMSDB(リリース20010401)を用い、解析ソフトMascot(マトリクスサイエンス社)にて検索照合した結果、マウスAOP2蛋白質(AOP2/1-Cys Prx/ non selenium glutathione peroxidase; GeneBank accession 番号AF004670、AF093852、Y12883)中の4カ所の部分アミノ酸配列が一致し、マウスAOP2蛋白質であることが判明した。これにより糖尿病態においてはAOP2蛋白質含量が増加することが明らかとなった。

【0029】

#### <実施例7>組織によるAOP2発現量の比較

配列番号13及び14に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)/55℃(30秒) 72℃(3分)のサイクルを35回繰り返した)によりAOP2をコードする673 bp(ベースペア)のcDNA断片の増幅をアガロースゲル電気泳動法により検出した。その結果、AOP2は主要臓器のう

ちPPAR $\gamma$ の作用がある脂肪・筋肉・肝臓・腎臓と、ほかに心臓での発現が顕著であった。これにより発現部位からもAOP2がPPAR $\gamma$ の転写共役因子であることが裏付けられた。

【0030】

<実施例8>PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するAOP2の調節作用の検出

上述の結果から、AOP2はPPAR $\gamma$ とリガンドを介して相互作用し、浮腫の惹起に関わること、さらにその発現亢進が糖尿病の病態と関連することが示された。そこでAOP2がPPAR $\gamma$ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドpCDNA-AOP2の作製

配列番号14及び15に示したプライマーを用いて、ヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobest DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)の後、98℃(5秒)/55℃(30秒) 72℃(3分)のサイクルを35回繰り返した)によりAOP2の全長域をコードする673bpを含むcDNA断片を取得した。これをpCDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)にin vitro組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpCDNA-AOP2を作製した。なおAOP2には終止コドン挿入せず、C末端がわにベクター由来のV5 epitopeおよびHis6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

(2) PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するAOP2の調節作用の検出

培養細胞COS-1細胞は6ウェル培養プレート(ウェル直径35mm)の培養皿に各ウェル2mlの10%牛胎児血清(シグマ社)を含む最少必須培地DME M(ギブコ社)を加えて70%コンフルエントの状態になるまで培養した。この細胞にリン酸カルシウム法(Graham Lら Virology、52巻456頁1973年、新井直子、遺伝子導入と発現/解析法13-15頁1994年

により、実施例5(1)により作製したGAL-PPAR $\gamma$ (0.15  $\mu$ g/ウェル)、およびGAL4結合配列を8個繰り返ルシフェラーゼ遺伝子上流に配置したレポーターコンストラクト(REX8-Luci,; 下川ら、国際公開番号WO99/04815)(0.8  $\mu$ g/ウェル)をpCDNA-AOP2(0.05-0.2  $\mu$ g/ウェル)とともに一過性にコトランスフェクトした。PPAR $\gamma$ アゴニストGW7282を2mM あるいは被験化合物を培地に添加して48時間培養した後、培地を除去し、細胞をリン酸緩衝液(以下PBSと略称する)で洗浄した後にウェルあたり0.4 mlの細胞溶解液(100mM リン酸カリウム(pH7.8)、0.2%トリトンX-100)を添加して細胞を溶解した。この細胞溶解液100  $\mu$ lにルシフェラーゼ基質溶液100  $\mu$ l(ピッカジーン社)を添加し、AB-210.0型 化学発光測定装置(アトー社)を用いて10秒間の発光量を測定した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子と同時に $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現遺伝子をもつプラスミドpCH110(アマシャムファルマシアバイオテク社)0.4  $\mu$ g/ウェルを細胞にコトランスフェクトし、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出キットGalacto-Light Plus<sup>TM</sup> system(アブライドバイオシステム社)を用いて $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定・数値化した。これを導入遺伝子のトランスフェクション効率として上述のルシフェラーゼ活性を各ウェル毎に補正した。

上記実験の結果、PPAR $\gamma$ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトランスフェクトしたAOP2発現プラスミドの用量に依存した促進が認められた(図5)。これにより、PPAR $\gamma$ とAOP2のアゴニスト依存的な相互作用が起これるとPPAR $\gamma$ の転写誘導活性が亢進することが明らかになった。

この事実と、腎臓を含む組織でAOP2の発現があり、糖尿病モデルマウスにおいてAOP2蛋白量が病態で亢進している前述の結果から、糖尿病の病態では細胞中のAOP2存在量が亢進し、それに伴う腎臓など特定組織での過剰なPPAR $\gamma$ 活性の促進が副作用(浮腫)をもたらすと考えられた。

AOP2はアミノ酸配列の相同性から分子内にペルオキシダーゼ様配列を持つことから抗オキシダント蛋白質2(anti-oxidant protein 2、(Genebank アクセッション番号XM\_001415))と呼称されてい

るが、実際の生理活性としてはカルシウム非依存性のフォスホオリパーゼA2として機能する報告があり (acidic calcium-independent phospholipase A2; Kim TSら、J Biol Chem 272巻16号10981頁1997年)、またマウスでは同Aop2蛋白質の遺伝子座が多嚢胞性腎症の原因遺伝子として報告されている (LTW4/Aop2; Iakoubova OAら Genomics 42巻3号 474-478頁1997年)。このようにAOP2はそのアミノ酸配列構造から予想される分子機能とは異なる作用を持つことが明らかであり、その本来の生理機能は確定されていない。AOP2がPPAR $\gamma$ とリガンド依存的に結合し、その転写共役因子として機能するという本発明者による発見は、該分子の機能における新規の知見である。このAOP2を利用することにより、PPAR $\gamma$ の作動薬から浮腫を惹起するものを発見・除去することが可能となる。

#### 【0031】

<実施例9> PPAR $\gamma$ を介した主作用を選択的に亢進する化合物のスクリーニング系

以上の知見から、実施例5におけるレポーターアッセイ系で検出可能なECHLPとPPAR $\gamma$ の相互作用、およびECHLPによるPPAR $\gamma$ のリガンド依存転写促進能の抑制は、これを阻害する化合物をスクリーニングすることによって糖代謝を改善し、糖尿病態の回復に寄与する新規の糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。さらにそこで得られる被験物質の中から、実施例8におけるレポーターアッセイ系で検出できるAOP2とPPAR $\gamma$ の相互作用、およびAOP2によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存転写促進能の亢進を阻害する物質をスクリーニングすることにより、副作用である浮腫を引き起こさずに糖尿病態の回復に寄与する糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。

すなをち実施例5、8と全く同様のレポーター活性測定系で被験化合物をスクリーニングできるが、より大量の被験化合物を効率よくスクリーニングするために下記のレポーターアッセイ系を構築した。

方法の詳細は前述の実施例5に示したものと同一とし、6ウェル培養プレートに培養細胞COS-1細胞を10%牛胎児血清を含む最少必須培地DMEM中で7

0%コンフルエントの状態になるまで培養した。同細胞にリン酸カルシウム法で GAL-PPAR $\gamma$  (0.15  $\mu$ g/ウェル)、およびREX8-Luci (0.8  $\mu$ g/ウェル)を、p cDNA-ECHLP (0.15  $\mu$ g/ウェル)とともにコトランスフェクトした。ここへ最終濃度0.1  $\mu$ MのPPAR $\gamma$ アゴニストGW7282と被験化合物(10-1.0  $\mu$ M)、あるいは被験化合物(10-1.0  $\mu$ M)のみを培地に添加して48時間培養した後、細胞をPBSで洗浄した後にウェルあたり0.4 mlの細胞溶解液を添加して溶解した。同液100  $\mu$ lを96ウェルプレートに移して前述実施例5の方法に従いルシフェラーゼ活性および $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定してPPAR $\gamma$ の活性化を数値化した。0.1  $\mu$ M GW7282添加条件下でECHLPの発現によるPPAR $\gamma$ の転写誘導能抑制(補正したルシフェラーゼ活性値の比)を基準とし、そこへ被験化合物を10あるいは1.0  $\mu$ M加えた条件で同転写誘導能抑制を阻害する化合物をやはりECHLPの発現によるルシフェラーゼ活性値の比を指標にスクリーニングした。このECHLPによるPPAR $\gamma$ 転写誘導能抑制を阻害あるいは阻害する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度(IC<sub>50</sub>)において、好ましくは10  $\mu$ M以下、さらに好ましくは1.0  $\mu$ M以下である。本スクリーニング系により、先に記載した化合物GI-262570は、10  $\mu$ MでECHLPによるリガンド(0.1  $\mu$ M GW7282)依存的なPPAR $\gamma$ 転写誘導能抑制を一部阻害した(図6a)。一方化合物GL-100085は、10  $\mu$ Mでも同転写誘導能抑制を阻害せず、GI-262570はPPAR $\gamma$ の主作用に特異性が高く、GL-100085の同主作用が低い化合物として実際に選択することができた。さらに同スクリーニング系で選択した被験化合物(10-1.0  $\mu$ M)を、同スクリーニング系のp cDNA-ECHLPをp cDNA-AOP2 (0.15  $\mu$ g/ウェル)に置き換えて構築したスクリーニング系に添加し、AOP2によるPPAR $\gamma$ の転写誘導能に対する被験化合物依存的な促進が存在するか上述と同様に補正したルシフェラーゼ活性を測定することにより検定した。このスクリーニング系により、上述の化合物GW7282およびGL-100085は、1.0-10  $\mu$ Mでその存在依存的にAOP2の共存下でPPAR $\gamma$ の転写誘導能を約4-5倍あるいは4-6倍に促進することを確認した。一方で化合物GI-2625

70は1.0  $\mu$ M、10  $\mu$ Mいずれにおいても同転写誘導能を3.5倍程度にし  
か促進しなかった(図6b)。これにより、本スクリーニング系を用いてPPA  
R $\gamma$ の副作用に特に特異性が高い化合物としてGL-100085を、また副作  
用惹起に比較的特異性の低い化合物としてGI-262570を、実際に選択す  
ることが可能であった。

#### 【0032】

<実施例10>組織によるFLJ13111の発現量の比較

配列番号18及び配列番号19に示したプライマーを用いて、ヒトcDNAライ  
ブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyrobes  
t DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)の後  
、98℃(5秒)/55℃(30秒) 72℃(3分)のサイクルを35回繰り  
返した)によりFLJ13111をコードするcDNA断片の増幅をアガロース  
ゲル電気泳動法により検出した。その結果、FLJ13111は主要臓器のうち  
PPAR $\gamma$ の作用がある筋肉・肝臓のほか、乳腺、肺、胎盤、卵巣、リンパ球、  
白血球での発現が顕著であったが、PPAR $\gamma$ リガンドの浮腫の惹起にかかわる  
腎臓では殆ど発現が見られなかった。これにより発現部位からFLJ13111  
はPPAR $\gamma$ の転写共役因子であることが裏付けられた。

#### 【0033】

<実施例11>PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111  
の調節作用の検出

上述の酵母ツーハイブリッド解析の結果から、FLJ13111はPPAR $\gamma$ と  
リガンドを介して相互作用することが示された。そこでFLJ13111がPP  
AR $\gamma$ の有する転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか、培養細胞COS-1  
を用いたレポーターアッセイで調査した。

(1) 動物細胞発現用プラスミドp cDNA-FLJ13111の作製

配列番号18及び配列番号19に示したプライマーを用いて、ヒト肝臓cDNA  
ライブラリー(クロンテック社)からPCR法(DNAポリメラーゼ(Pyro  
best DNA polymerase; 宝酒造社)を用い、98℃(1分)  
の後、98℃(5秒)/55℃(30秒) 72℃(3分)のサイクルを35回

繰り返した)により配列番号16に示すFLJ13111をコードする897bpを含むcDNA断片を取得した。これをpCDNA3.1/V5-His-TOPOベクター(インビトロジェン社)に*in vitro*組換えによるTOPOクローニング法(インビトロジェン社)により挿入して動物細胞発現用プラスミドpcDNA-FLJ13111を作製した。なおFLJ13111には終止コドン挿入せず、C末端がわにベクター由来のV5 epitopeおよびHis6タグが融合されるようにプライマーを設計した。

## (2) PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111の調節作用の検出

上述実施例5(3)と同様の方法でpcDNA-ECHLPをpcDNA-FLJ13111に置き換えることにより、PPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対するFLJ13111の作用をレポーターアッセイで測定する系を作製した。PPAR $\gamma$ アゴニストであるロジグリタゾン1mMを培地に添加してルシフェラーゼ活性を測定した結果、PPAR $\gamma$ のアゴニスト依存的な転写誘導活性は、細胞にトランスフェクトしたFLJ13111発現プラスミドの用量に依存した促進が認められた(図7)。これにより、PPAR $\gamma$ とFLJ13111のアゴニスト依存的な相互作用が起こるとPPAR $\gamma$ の転写誘導活性が亢進することが明らかになった。

この事実と、PPAR $\gamma$ リガンドの浮腫の惹起にかかわる腎臓でFLJ13111の発現が殆ど無いことから、FLJ13111によるPPAR $\gamma$ 活性の促進は、副作用でなく主作用を増強すると考えられた。

FLJ13111は機能未知の蛋白質であり、アミノ酸配列から分子内に細胞核内の存在を示唆する核標的配列(Nuclear Targeting Sequence)やグリコシル化を受けうる部位(N-glycosylation site)の存在が予想される他は、アミノ酸配列構造から分子機能を示唆する情報はなかった。FLJ13111がPPAR $\gamma$ とリガンド依存的に結合し、その転写共役因子として機能するという本発明者による発見は、該分子の機能における新規の知見である。このFLJ13111を利用することにより、PPAR $\gamma$ の主作用選択的な作動薬を発見することが可能である。

## 【0034】

＜実施例12＞PPAR $\gamma$ を介したFLJ13111のリガンド選択的作用の検出、およびPPAR $\gamma$ を介した主作用を選択的に亢進する化合物のスクリーニング系

以上の知見から、実施例11におけるレポーターアッセイ系で検出可能なFLJ13111によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存転写促進能の亢進作用は、これを促進する化合物をスクリーニングすることによって糖代謝を改善し、糖尿病態の回復に寄与する新規の糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。またさらにそこで得られる被験物質の中から、実施例8におけるレポーターアッセイ系で検出できるAOP2とPPAR $\gamma$ の相互作用、およびAOP2によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存転写促進能の亢進を阻害する物質をスクリーニングすることにより、副作用である浮腫を引き起こさずに糖尿病態の回復に寄与する糖尿病治療薬のスクリーニングが可能である。

すなわち実施例11と全く同様のレポーター活性測定系で被験化合物をスクリーニングできるが、実際に同系で主作用特異的なリガンドを副作用リガンドと区別して選択できることを証明し、かつ大量の被験化合物を効率よくスクリーニングするために下記のレポーターアッセイ系を構築し実施した。

方法の詳細は前述の実施例5に示したものと同一とし、p cDNA-ECHLPをp cDNA-FLJ13111に置き換える形で行った。

被験化合物、ここではPPAR $\gamma$ アゴニストであるロジグリタゾン、ピオグリタゾンまたはGL-100085の各10-1.0  $\mu$ Mを培地に添加して48時間培養した後、実施例5と同様にしてPPAR $\gamma$ の活性化を数値化した。被験化合物の添加、非添加の各条件下でFLJ13111の発現(p cDNA-FLJ13111を0.1  $\mu$ g/ウェル添加)によるPPAR $\gamma$ の転写誘導能促進(補正したルシフェラーゼ活性値の比)を指標にスクリーニングした。このFLJ13111によるPPAR $\gamma$ 転写誘導能を促進する物質をスクリーニングする基準は、阻害活性強度(IC<sub>50</sub>)において、好ましくは10  $\mu$ M以下、さらに好ましくは1.0  $\mu$ M以下とした。本スクリーニング系により、ロジグリタゾンおよびロジグリタゾンは、1  $\mu$ MでFLJ13111による被験化合物依存的なPPAR $\gamma$ 転写

誘導能を促進した。一方化合物GL-100085は、10  $\mu$ Mでも同転写誘導能を促進せず、ロジグリタゾン、ピオグリタゾンはPPAR  $\gamma$ の主作用に特異性が高く、GL-100085は同主作用が低い化合物として実際に選択することが可能であった。

【0035】

【発明の効果】

本発明のリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法により得られた、主作用リガンド依存性PPAR結合分子ECHLP、主作用リガンド選択的PPAR  $\gamma$ 作用因子FLJ13111、および副作用リガンド依存性PPAR結合分子AOP2を用いることにより、主作用を選択的にもたらし、副作用を引き起こさない化合物を同定・スクリーニングすることを可能にした。前記スクリーニング系により選択された物質は、インスリン抵抗性改善薬の候補物質として有用である。

【0036】

【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号9、10、11、13の配列で表される各塩基配列は、人工的に合成したプライマー配列である。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co.,Ltd.

<120> A screening method for detecting a new class of PPAR modulators with lower side effects

<130> 3183IP

&lt;160&gt; 19

&lt;170&gt; PatentIn version 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1518

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1518)

&lt;400&gt; 1

atg ggt gaa act ctg gga gat tct cct att gac cca gaa agc gat tcc 48

Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser

1 5 10 15

ttc act gat aca ctg tct gca aac ata tca caa gaa atg acc atg gtt 96

Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val

20 25 30

gac aca gag atg cca ttc tgg ccc acc aac ttt ggg atc agc tcc gtg 144

Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val

35 40 45

gat ctc tcc gta atg gaa gac cac tcc cac tcc ttt gat atc aag ccc 192

Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro

50 55 60

ttc act act gtt gac ttc tcc agc att tct act cca cat tac gaa gac 240

Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp

65 70 75 80

att cca ttc aca aga aca gat cca gtg gtt gca gat tac aag tat gac 288

Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp

85 90 95

ctg aaa ctt caa gag tac caa agt gca atc aaa gtg gag cct gca tct 336

Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser

100 105 110

cca cct tat tat tct gag aag act cag ctc tac aat aag cct cat gaa 384

Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu

115 120 125

gag cct tcc aac tcc ctc atg gca att gaa tgt cgt gtc tgt gga gat 432

Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp

130 135 140

aaa gct tct gga ttt cac tat gga gtt cat gct tgt gaa gga tgc aag 480

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys

145 150 155 160

ggt ttc ttc cgg aga aca atc aga ttg aag ctt atc tat gac aga tgt 528

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys

165 170 175

gat ctt aac tgt cgg atc cac aaa aaa agt aga aat aaa tgt cag tac 576  
Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr

180

185

190

tgt cgg ttt cag aaa tgc ctt gca gtg ggg atg tct cat aat gcc atc 624  
Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile

195

200

205

agg ttt ggg cgg atg cca cag gcc gag aag gag aag ctg ttg gcg gag 672  
Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu

210

215

220

atc tcc agt gat atc gac cag ctg aat cca gag tcc gct gac ctc cgg 720  
Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg

225

230

235

240

gcc ctg gca aaa cat ttg tat gac tca tac ata aag tcc ttc ccg ctg 768  
Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu

245

250

255

acc aaa gca aag gcg agg gcg atc ttg aca gga aag aca aca gac aaa 816  
Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys

260

265

270

tca cca ttc gtt atc tat gac atg aat tcc tta atg atg gga gaa gat 864  
Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp

275

280

285

aaa atc aag ttc aaa cac atc acc ccc ctg cag gag cag agc aaa gag 912

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu

290

295

300

gtg gcc atc cgc atc ttt cag ggc tgc cag ttt cgc tcc gtg gag gct 960

Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala

305

310

315

320

gtg cag gag atc aca gag tat gcc aaa agc att cct ggt ttt gta aat 1008

Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn

325

330

335

ctt gac ttg aac gac caa gta act ctc ctc aaa tat gga gtc cac gag 1056

Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu

340

345

350

atc att tac aca atg ctg gcc tcc ttg atg aat aaa gat ggg gtt ctc 1104

Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu

355

360

365

ata tcc gag ggc caa ggc ttc atg aca agg gag ttt cta aag agc ctg 1152

Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu

370

375

380

cga aag cct ttt ggt gac ttt atg gag ccc aag ttt gag ttt gct gtg 1200

Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val

385

390

395

400

aag ttc aat gca ctg gaa tta gat gac agc gac ttg gca ata ttt att 1248

Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile

405

410

415

gct gtc att att ctc agt gga gac cgc cca ggt ttg ctg aat gtg aag 1296

Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys

420

425

430

ccc att gaa gac att caa gac aac ctg cta caa gcc ctg gag ctc cag 1344

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln

435

440

445

ctg aag ctg aac cac cct gag tcc tca cag ctg ttt gcc aag ctg ctc 1392

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu

450

455

460

cag aaa atg aca gac ctc aga cag att gtc acg gaa cac gtg cag cta 1440

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu

465

470

475

480

ctg cag gtg atc aag aag acg gag aca gac atg agt ctt cac ccg ctc 1488

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

485

490

495

ctg cag gag atc tac aag gac ttg tac tag 1518

Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr

500

505

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 505

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser

1 5 10 15

Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val

20 25 30

Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val

35 40 45

Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro

50 55 60

Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp

65 70 75 80

Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp

85 90 95

Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser

100

105

110

Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu

115

120

125

Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp

130

135

140

Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys

145

150

155

160

Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys

165

170

175

Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr

180

185

190

Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile

195

200

205

Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu

210

215

220

Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg

225

230

235

240

Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu

245

250

255

Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys

260

265

270

Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp

275

280

285

Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu

290

295

300

Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala

305

310

315

320

Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn

325

330

335

Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu

340

345

350

Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu

355

360

365

Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu

370

375

380

Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val

385

390

395

400

Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile

405

410

415

Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys

420

425

430

Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln

435

440

445

Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu

450

455

460

Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu

465

470

475

480

Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu

485

490

495

Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr

500

505

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 987

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(987)

&lt;400&gt; 3

atg gcg gcg ggg ata gtg gct tct cgc aga ctc cgc gac cta ctg acc 48

Met Ala Ala Gly Ile Val Ala Ser Arg Arg Leu Arg Asp Leu Leu Thr

1

5

10

15

cgg cga ctg aca ggc tcc aac tac ccg gga ctc agt att agc ctt cgc 96

Arg Arg Leu Thr Gly Ser Asn Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Ser Leu Arg

20

25

30

ctc act ggc tcc tct gca caa gag gcg gct tcc gga gta gcc ctc ggt 144

Leu Thr Gly Ser Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ser Gly Val Ala Leu Gly

35

40

45

gaa gcc cca gac cac agc tat gag tcc ctt cgt gtg acg tct gcg cag 192

Glu Ala Pro Asp His Ser Tyr Glu Ser Leu Arg Val Thr Ser Ala Gln

50

55

60

aaa cat gtt ctg cat gtc cag ctc aac cgg ccc aac aag agg aat gcc 240

Lys His Val Leu His Val Gln Leu Asn Arg Pro Asn Lys Arg Asn Ala

65

70

75

80

atg aac aag gtc ttc tgg aga gag atg gta gag tgc ttc aac aag att 288

Met Asn Lys Val Phe Trp Arg Glu Met Val Glu Cys Phe Asn Lys Ile

85

90

95

tcg aga gac gct gac tgt cgg gcg gtg gtg atc tct ggt gca gga aaa 336

Ser Arg Asp Ala Asp Cys Arg Ala Val Val Ile Ser Gly Ala Gly Lys

100

105

110

atg ttc act gca ggt att gac ctg atg gac atg gct tcg gac atc ctg 384

Met Phe Thr Ala Gly Ile Asp Leu Met Asp Met Ala Ser Asp Ile Leu

115

120

125

cag ccc aaa gga gat gat gtg gcc cgg atc agc tgg tac ctc cgt gac 432

Gln Pro Lys Gly Asp Asp Val Ala Arg Ile Ser Trp Tyr Leu Arg Asp

130

135

140

atc atc act cga tac cag gag acc ttc aac gtc atc gag agg tgc ccc 480

Ile Ile Thr Arg Tyr Gln Glu Thr Phe Asn Val Ile Glu Arg Cys Pro

145

150

155

160

aag ccc gtg att gct gcc gtc cat ggg ggc tgc att ggc gga ggt gtg 528

Lys Pro Val Ile Ala Ala Val His Gly Gly Cys Ile Gly Gly Gly Val

165

170

175

gac ctt gtc acc gcc tgt gac atc cgg tac tgt gcc cag gat gct ttc 576

Asp Leu Val Thr Ala Cys Asp Ile Arg Tyr Cys Ala Gln Asp Ala Phe

180

185

190

ttc cag gtg aag gag gtg gac gtg ggt ttg gct gcc gat gta gga aca 624

Phe Gln Val Lys Glu Val Asp Val Gly Leu Ala Ala Asp Val Gly Thr

195

200

205

ctg cag cgc ctg ccc aag gtc atc ggg aac cag agc ctg gtc aac gag 672

Leu Gln Arg Leu Pro Lys Val Ile Gly Asn Gln Ser Leu Val Asn Glu

210

215

220

ctg gcc ttc acc gcc cgc aag atg atg gct gac gag gcc ctg ggc agt 720

Leu Ala Phe Thr Ala Arg Lys Met Met Ala Asp Glu Ala Leu Gly Ser

225

230

235

240

ggg ctg gtc agc cgg gtg ttc cca gac aaa gag gtc atg ctg gat gct 768  
Gly Leu Val Ser Arg Val Phe Pro Asp Lys Glu Val Met Leu Asp Ala  
245 250 255

gcc tta gcg ctg gcg gcc gag att tcc agc aag agc ccc gtg gcg gtg 816  
Ala Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ile Ser Ser Lys Ser Pro Val Ala Val  
260 265 270

cag agc acc aag gtc aac ctg ctg tat tcc cgc gac cat tcg gtg gcc 864  
Gln Ser Thr Lys Val Asn Leu Leu Tyr Ser Arg Asp His Ser Val Ala  
275 280 285

gag agc ctc aac tac gtg gcg tcc tgg aac atg agc atg ctg cag acc 912  
Glu Ser Leu Asn Tyr Val Ala Ser Trp Asn Met Ser Met Leu Gln Thr  
290 295 300

caa gac ctc gtg aag tcg gtc cag gcc acg act gag aac aag gaa ctg 960  
Gln Asp Leu Val Lys Ser Val Gln Ala Thr Thr Glu Asn Lys Glu Leu  
305 310 315 320

aaa acc gtc acc ttc tcc aag ctc tga 987  
Lys Thr Val Thr Phe Ser Lys Leu  
325

<210> 4

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Met Ala Ala Gly Ile Val Ala Ser Arg Arg Leu Arg Asp Leu Leu Thr  
1 5 10 15

Arg Arg Leu Thr Gly Ser Asn Tyr Pro Gly Leu Ser Ile Ser Leu Arg  
20 25 30

Leu Thr Gly Ser Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ser Gly Val Ala Leu Gly  
35 40 45

Glu Ala Pro Asp His Ser Tyr Glu Ser Leu Arg Val Thr Ser Ala Gln  
50 55 60

Lys His Val Leu His Val Gln Leu Asn Arg Pro Asn Lys Arg Asn Ala  
65 70 75 80

Met Asn Lys Val Phe Trp Arg Glu Met Val Glu Cys Phe Asn Lys Ile  
85 90 95

Ser Arg Asp Ala Asp Cys Arg Ala Val Val Ile Ser Gly Ala Gly Lys  
100 105 110

Met Phe Thr Ala Gly Ile Asp Leu Met Asp Met Ala Ser Asp Ile Leu

115

120

125

Gln Pro Lys Gly Asp Asp Val Ala Arg Ile Ser Trp Tyr Leu Arg Asp

130

135

140

Ile Ile Thr Arg Tyr Gln Glu Thr Phe Asn Val Ile Glu Arg Cys Pro

145

150

155

160

Lys Pro Val Ile Ala Ala Val His Gly Gly Cys Ile Gly Gly Gly Val

165

170

175

Asp Leu Val Thr Ala Cys Asp Ile Arg Tyr Cys Ala Gln Asp Ala Phe

180

185

190

Phe Gln Val Lys Glu Val Asp Val Gly Leu Ala Ala Asp Val Gly Thr

195

200

205

Leu Gln Arg Leu Pro Lys Val Ile Gly Asn Gln Ser Leu Val Asn Glu

210

215

220

Leu Ala Phe Thr Ala Arg Lys Met Met Ala Asp Glu Ala Leu Gly Ser  
 225 230 235 240

Gly Leu Val Ser Arg Val Phe Pro Asp Lys Glu Val Met Leu Asp Ala  
 245 250 255

Ala Leu Ala Leu Ala Ala Glu Ile Ser Ser Lys Ser Pro Val Ala Val  
 260 265 270

Gln Ser Thr Lys Val Asn Leu Leu Tyr Ser Arg Asp His Ser Val Ala  
 275 280 285

Glu Ser Leu Asn Tyr Val Ala Ser Trp Asn Met Ser Met Leu Gln Thr  
 290 295 300

Gln Asp Leu Val Lys Ser Val Gln Ala Thr Thr Glu Asn Lys Glu Leu  
 305 310 315 320

Lys Thr Val Thr Phe Ser Lys Leu  
 325

<210> 5  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1407)

<400> 5

atg gtg gac acg gaa agc cca ctc tgc ccc ctc tcc cca ctc gag gcc 48  
 Met Val Asp Thr Glu Ser Pro Leu Cys Pro Leu Ser Pro Leu Glu Ala  
 1 5 10 15

ggc gat cta gag agc ccg tta tct gaa gag ttc ctg caa gaa atg gga 96  
 Gly Asp Leu Glu Ser Pro Leu Ser Glu Glu Phe Leu Gln Glu Met Gly  
 20 25 30

aac atc caa gag att tcg caa tcc atc ggc gag gat agt tct gga agc 144  
 Asn Ile Gln Glu Ile Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asp Ser Ser Gly Ser  
 35 40 45

ttt ggc ttt acg gaa tac cag tat tta gga agc tgt cct ggc tca gat 192  
 Phe Gly Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Leu Gly Ser Cys Pro Gly Ser Asp  
 50 55 60

ggc tcg gtc atc acg gac acg ctt tca cca gct tcg agc ccc tcc tcg 240  
 Gly Ser Val Ile Thr Asp Thr Leu Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Ser  
 65 70 75 80

gtg act tat cct gtg gtc ccc ggc agc gtg gac gag tct ccc agt gga	288
Val Thr Tyr Pro Val Val Pro Gly Ser Val Asp Glu Ser Pro Ser Gly	
85 90 95	
gca ttg aac atc gaa tgt aga atc tgc ggg gac aag gcc tca ggc tat	336
Ala Leu Asn Ile Glu Cys Arg Ile Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Tyr	
100 105 110	
cat tac gga gtc cac gcg tgt gaa ggc tgc aag ggc ttc ttt cgg cga	384
His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg	
115 120 125	
acg att cga ctc aag ctg gtg tat gac aag tgc gac cgc agc tgc aag	432
Thr Ile Arg Leu Lys Leu Val Tyr Asp Lys Cys Asp Arg Ser Cys Lys	
130 135 140	
atc cag aaa aag aac aga aac aaa tgc cag tat tgt cga ttt cac aag	480
Ile Gln Lys Lys Asn Arg Asn Lys Cys Gln Tyr Cys Arg Phe His Lys	
145 150 155 160	
tgc ctt tct gtc ggg atg tca cac aac gcg att cgt ttt gga cga atg	528
Cys Leu Ser Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile Arg Phe Gly Arg Met	
165 170 175	
cca aga tct gag aaa gca aaa ctg aaa gca gaa att ctt acc tgt gaa	576
Pro Arg Ser Glu Lys Ala Lys Leu Lys Ala Glu Ile Leu Thr Cys Glu	
180 185 190	

cat gac ata gaa gat tct gaa act gca gat ctc aaa tct ctg gcc aag 624  
His Asp Ile Glu Asp Ser Glu Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ala Lys  
195 200 205

aga atc tac gag gcc tac ttg aag aac ttc aac atg aac aag gtc aaa 672  
Arg Ile Tyr Glu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Asn Met Asn Lys Val Lys  
210 215 220

gcc cgg gtc atc ctc tca gga aag gcc agt aac aat cca cct ttt gtc 720  
Ala Arg Val Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ser Asn Asn Pro Pro Phe Val  
225 230 235 240

ata cat gat atg gag aca ctg tgt atg gct gag aag acg ctg gtg gcc 768  
Ile His Asp Met Glu Thr Leu Cys Met Ala Glu Lys Thr Leu Val Ala  
245 250 255

aag ctg gtg gcc aat ggc atc cag aac aag gag gcg gag gtc cgc atc 816  
Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile  
260 265 270

ttt cac tgc tgc cag tgc acg tca gtg gag acc gtc acg gag ctc acg 864  
Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr  
275 280 285

gaa ttc gcc aag gcc atc cca ggc ttc gca aac ttg gac ctg aac gat 912  
Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp  
290 295 300

caa gtg aca ttg cta aaa tac gga gtt tat gag gcc ata ttc gcc atg 960

Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met  
 305 310 315 320

ctg tct tct gtg atg aac aaa gac ggg atg ctg gta gcg tat gga aat 1008  
 Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn  
 325 330 335

ggg ttt ata act cgt gaa ttc cta aaa agc cta agg aaa ccg ttc tgt 1056  
 Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys  
 340 345 350

gat atc atg gaa ccc aag ttt gat ttt gcc atg aag ttc aat gca ctg 1104  
 Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu  
 355 360 365

gaa ctg gat gac agt gat atc tcc ctt ttt gtg gct gct atc att tgc 1152  
 Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys  
 370 375 380

tgt gga gat cgt cct ggc ctt cta aac gta gga cac att gaa aaa atg 1200  
 Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met  
 385 390 395 400

cag gag ggt att gta cat gtg ctc aga ctc cac ctg cag agc aac cac 1248  
 Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His  
 405 410 415

ccg gac gat atc ttt ctc ttc cca aaa ctt ctt caa aaa atg gca gac 1296  
 Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp

420

425

430

ctc cgg cag ctg gtg acg gag cat gcg cag ctg gtg cag atc atc aag 1344  
 Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys  
 435 440 445

aag acg gag tcg gat gct gcg ctg cac ccg cta ctg cag gag atc tac 1392  
 Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr  
 450 455 460

agg gac atg tac tga 1407  
 Arg Asp Met Tyr  
 465

<210> 6

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Val Asp Thr Glu Ser Pro Leu Cys Pro Leu Ser Pro Leu Glu Ala  
 1 5 10 15

Gly Asp Leu Glu Ser Pro Leu Ser Glu Glu Phe Leu Gln Glu Met Gly  
 20 25 30

Asn Ile Gln Glu Ile Ser Gln Ser Ile Gly Glu Asp Ser Ser Gly Ser

35

40

45

Phe Gly Phe Thr Glu Tyr Gln Tyr Leu Gly Ser Cys Pro Gly Ser Asp

50

55

60

Gly Ser Val Ile Thr Asp Thr Leu Ser Pro Ala Ser Ser Pro Ser Ser

65

70

75

80

Val Thr Tyr Pro Val Val Pro Gly Ser Val Asp Glu Ser Pro Ser Gly

85

90

95

Ala Leu Asn Ile Glu Cys Arg Ile Cys Gly Asp Lys Ala Ser Gly Tyr

100

105

110

His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg

115

120

125

Thr Ile Arg Leu Lys Leu Val Tyr Asp Lys Cys Asp Arg Ser Cys Lys

130

135

140

Ile Gln Lys Lys Asn Arg Asn Lys Cys Gln Tyr Cys Arg Phe His Lys  
145 150 155 160

Cys Leu Ser Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile Arg Phe Gly Arg Met  
165 170 175

Pro Arg Ser Glu Lys Ala Lys Leu Lys Ala Glu Ile Leu Thr Cys Glu  
180 185 190

His Asp Ile Glu Asp Ser Glu Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ala Lys  
195 200 205

Arg Ile Tyr Glu Ala Tyr Leu Lys Asn Phe Asn Met Asn Lys Val Lys  
210 215 220

Ala Arg Val Ile Leu Ser Gly Lys Ala Ser Asn Asn Pro Pro Phe Val  
225 230 235 240

Ile His Asp Met Glu Thr Leu Cys Met Ala Glu Lys Thr Leu Val Ala  
245 250 255

Lys Leu Val Ala Asn Gly Ile Gln Asn Lys Glu Ala Glu Val Arg Ile

260

265

270

Phe His Cys Cys Gln Cys Thr Ser Val Glu Thr Val Thr Glu Leu Thr

275

280

285

Glu Phe Ala Lys Ala Ile Pro Gly Phe Ala Asn Leu Asp Leu Asn Asp

290

295

300

Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val Tyr Glu Ala Ile Phe Ala Met

305

310

315

320

Leu Ser Ser Val Met Asn Lys Asp Gly Met Leu Val Ala Tyr Gly Asn

325

330

335

Gly Phe Ile Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Cys

340

345

350

Asp Ile Met Glu Pro Lys Phe Asp Phe Ala Met Lys Phe Asn Ala Leu

355

360

365

Glu Leu Asp Asp Ser Asp Ile Ser Leu Phe Val Ala Ala Ile Ile Cys

370

375

380

Cys Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Gly His Ile Glu Lys Met  
385 390 395 400

Gln Glu Gly Ile Val His Val Leu Arg Leu His Leu Gln Ser Asn His  
405 410 415

Pro Asp Asp Ile Phe Leu Phe Pro Lys Leu Leu Gln Lys Met Ala Asp  
420 425 430

Leu Arg Gln Leu Val Thr Glu His Ala Gln Leu Val Gln Ile Ile Lys  
435 440 445

Lys Thr Glu Ser Asp Ala Ala Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr  
450 455 460

Arg Asp Met Tyr  
465

<210> 7

<211> 675

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(675)

<400> 7

atg	ccc	gga	ggt	ctg	ctt	ctc	ggg	gac	gtg	gct	ccc	aac	ttt	gag	gcc	48
Met	Pro	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Pro	Asn	Phe	Glu	Ala	
1			5					10					15			

aat	acc	acc	gtc	ggc	cgc	atc	cgt	ttc	cac	gac	ttt	ctg	gga	gac	tca	96
Asn	Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Ile	Arg	Phe	His	Asp	Phe	Leu	Gly	Asp	Ser	
			20				25					30				

tgg	ggc	att	ctc	ttc	tcc	cac	cct	cgg	gac	ttt	acc	cca	gtg	tgc	acc	144
Trp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ser	His	Pro	Arg	Asp	Phe	Thr	Pro	Val	Cys	Thr	
			35				40					45				

aca	gag	ctt	ggc	aga	gct	gca	aag	ctg	gca	cca	gaa	ttt	gcc	aag	agg	192
Thr	Glu	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Pro	Glu	Phe	Ala	Lys	Arg	
			50				55					60				

aat	gtt	aag	ttg	att	gcc	ctt	tca	ata	gac	agt	gtt	gag	gac	cat	ctt	240
Asn	Val	Lys	Leu	Ile	Ala	Leu	Ser	Ile	Asp	Ser	Val	Glu	Asp	His	Leu	
65						70				75				80		

gcc	tgg	agc	aag	gat	atc	aat	gct	tac	aat	tgt	gaa	gag	ccc	aca	gaa	288
Ala	Trp	Ser	Lys	Asp	Ile	Asn	Ala	Tyr	Asn	Cys	Glu	Glu	Pro	Thr	Glu	

85

90

95

aag tta cct ttt ccc atc atc gat gat agg aat cgg gag ctt gcc atc 336

Lys Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile

100

105

110

ctg ttg ggc atg ctg gat cca gca gag aag gat gaa aag ggc atg cct 384

Leu Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro

115

120

125

gtg aca gct cgt gtg gtg ttt gtt ttt ggt cct gat aag aag ctg aag 432

Val Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys

130

135

140

ctg tct atc ctc tac cca gct acc act ggc agg aac ttt gat gag att 480

Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile

145

150

155

160

ctc agg gta gtc atc tct ctc cag ctg aca gca gaa aaa agg gtt gcc 528

Leu Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala

165

170

175

acc cca gtt gat tgg aag gat ggg gat agt gtg atg gtc ctt cca acc 576

Thr Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr

180

185

190

atc cct gaa gaa gaa gcc aaa aaa ctt ttc ccg aaa gga gtc ttc acc 624

Ile Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr

195

200

205

aaa gag ctc cca tct ggc aag aaa tac ctc cgc tac aca ccc cag cct 672

Lys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro

210

215

220

taa

675

<210> 8

<211> 224

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Pro Gly Gly Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Glu Ala

1

5

10

15

Asn Thr Thr Val Gly Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser

20

25

30

Trp Gly Ile Leu Phe Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr

35

40

45

Thr Glu Leu Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg

50

55

60

Asn Val Lys Leu Ile Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu  
65 70 75 80

Ala Trp Ser Lys Asp Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu  
85 90 95

Lys Leu Pro Phe Pro Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile  
100 105 110

Leu Leu Gly Met Leu Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro  
115 120 125

Val Thr Ala Arg Val Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys  
130 135 140

Leu Ser Ile Leu Tyr Pro Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile  
145 150 155 160

Leu Arg Val Val Ile Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala  
165 170 175

Thr Pro Val Asp Trp Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr  
 180 185 190

Ile Pro Glu Glu Glu Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr  
 195 200 205

Lys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro  
 210 215 220

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 9

agagagtagt aacaaagggtc aaagacagtt gactgtatcg ggtacctctc ataatgccat 60

cagg

64

<210> 10

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 10

tgagacttg accaaacctc tggcgaagaa gtccaaagct cccgggctag tacaagtcct 60

tgtag 65

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> The sequence of the 5183th(5') to 5162th(3') bases in cloning vector pACT2 (GeneBank U29899)

<400> 11

cgcgtttgga atcactacag gg 22

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

atggcggcgg ggatagtg

18

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 13

gtagagcttg gagaaggtga cg

22

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

atgcccgag gtctgcttc

19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

aaggctgggg tgtgtagcg

19

<210> 16

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<400> 16

atg gct gac cac aac cct gac agc gac tcc acg ccg cgc acg ctg ctg 48

Met Ala Asp His Asn Pro Asp Ser Asp Ser Thr Pro Arg Thr Leu Leu

1 5 10 15

cga cgc gtg ctg gat aca gcg gac ccg cgc acc ccg cgg cga ccc cgg 96

Arg Arg Val Leu Asp Thr Ala Asp Pro Arg Thr Pro Arg Arg Pro Arg

20 25 30

agt gct cgg gct gga gcc cgg aga gcc ctg ctt gaa acg gct tcc ccc 144

Ser Ala Arg Ala Gly Ala Arg Arg Ala Leu Leu Glu Thr Ala Ser Pro

35 40 45

agg aag ttg agt ggc caa aca agg acg ata gcc aga ggg cgt tcc cat 192

Arg Lys Leu Ser Gly Gln Thr Arg Thr Ile Ala Arg Gly Arg Ser His

50

55

60

gga gcc agg tct gtt ggc aga tcg gcc cat att cag gcc agt ggg cac 240

Gly Ala Arg Ser Val Gly Arg Ser Ala His Ile Gln Ala Ser Gly His

65

70

75

80

ttg gag gaa cag aca cct cgg acg ctg ctg aag aac atc cta cta act 288

Leu Glu Glu Gln Thr Pro Arg Thr Leu Leu Lys Asn Ile Leu Leu Thr

85

90

95

gcc cca gaa tct tcc atc ctg atg cct gag tcg gta gtg aag cca gtg 336

Ala Pro Glu Ser Ser Ile Leu Met Pro Glu Ser Val Val Lys Pro Val

100

105

110

cca gca ccg cag gcg gtc caa ccc tcc aga caa gag agc agt tgc ggc 384

Pro Ala Pro Gln Ala Val Gln Pro Ser Arg Gln Glu Ser Ser Cys Gly

115

120

125

agc ctg gag ctg caa ctt cct gag ctc gag ccc ccc aca acc ctg gct 432

Ser Leu Glu Leu Gln Leu Pro Glu Leu Glu Pro Pro Thr Thr Leu Ala

130

135

140

cca ggt ctg ctg gcc cct ggc agg agg aaa cag agg ctg aga ctg tca 480

Pro Gly Leu Leu Ala Pro Gly Arg Arg Lys Gln Arg Leu Arg Leu Ser

145

150

155

160

gtg ttt cag cag gga gtg gac cag ggg ctg tct ctc tcc caa gag cct 528

Val Phe Gln Gln Gly Val Asp Gln Gly Leu Ser Leu Ser Gln Glu Pro

165

170

175

caa ggg aat gct gat gcc tct tcc ctc acc aga tcc ctc aac ctg acc 576

Gln Gly Asn Ala Asp Ala Ser Ser Leu Thr Arg Ser Leu Asn Leu Thr

180

185

190

ttt gcc aca cct ctt cag cca cag tca gtg cag agg cct ggc ttg gcc 624

Phe Ala Thr Pro Leu Gln Pro Gln Ser Val Gln Arg Pro Gly Leu Ala

195

200

205

cgc aga cct cca gcc cgc cga gct gta gac gtg ggt gcc ttt ttg cgg 672

Arg Arg Pro Pro Ala Arg Arg Ala Val Asp Val Gly Ala Phe Leu Arg

210

215

220

gat ctg cga gat act tcc ctg gct cct cca aac att gtg ttg gag gac 720

Asp Leu Arg Asp Thr Ser Leu Ala Pro Pro Asn Ile Val Leu Glu Asp

225

230

235

240

acc cag ccg ttc tct cag ccc atg gtt ggc tcc ccc aac gtg tat cac 768

Thr Gln Pro Phe Ser Gln Pro Met Val Gly Ser Pro Asn Val Tyr His

245

250

255

tcc ctg ccc tgc acg cct cac act ggg gct gaa gac gct gag cag gct 816

Ser Leu Pro Cys Thr Pro His Thr Gly Ala Glu Asp Ala Glu Gln Ala

260

265

270

gcc ggt cgc aag aca cag agc agt ggg cct ggg ctg cag aag aat agt 864

Ala Gly Arg Lys Thr Gln Ser Ser Gly Pro Gly Leu Gln Lys Asn Ser

275

280

285

gag tgt gtg gca ctg gtg gcc tgg agc caa att tag

900

Glu Cys Val Ala Leu Val Ala Trp Ser Gln Ile

290

295

<210> 17

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Asp His Asn Pro Asp Ser Asp Ser Thr Pro Arg Thr Leu Leu

1

5

10

15

Arg Arg Val Leu Asp Thr Ala Asp Pro Arg Thr Pro Arg Arg Pro Arg

20

25

30

Ser Ala Arg Ala Gly Ala Arg Arg Ala Leu Leu Glu Thr Ala Ser Pro

35

40

45

Arg Lys Leu Ser Gly Gln Thr Arg Thr Ile Ala Arg Gly Arg Ser His

50

55

60

Gly Ala Arg Ser Val Gly Arg Ser Ala His Ile Gln Ala Ser Gly His  
65 70 75 80

Leu Glu Glu Gln Thr Pro Arg Thr Leu Leu Lys Asn Ile Leu Leu Thr  
85 90 95

Ala Pro Glu Ser Ser Ile Leu Met Pro Glu Ser Val Val Lys Pro Val  
100 105 110

Pro Ala Pro Gln Ala Val Gln Pro Ser Arg Gln Glu Ser Ser Cys Gly  
115 120 125

Ser Leu Glu Leu Gln Leu Pro Glu Leu Glu Pro Pro Thr Thr Leu Ala  
130 135 140

Pro Gly Leu Leu Ala Pro Gly Arg Arg Lys Gln Arg Leu Arg Leu Ser  
145 150 155 160

Val Phe Gln Gln Gly Val Asp Gln Gly Leu Ser Leu Ser Gln Glu Pro  
165 170 175

Gln Gly Asn Ala Asp Ala Ser Ser Leu Thr Arg Ser Leu Asn Leu Thr

180

185

190

Phe Ala Thr Pro Leu Gln Pro Gln Ser Val Gln Arg Pro Gly Leu Ala

195

200

205

Arg Arg Pro Pro Ala Arg Arg Ala Val Asp Val Gly Ala Phe Leu Arg

210

215

220

Asp Leu Arg Asp Thr Ser Leu Ala Pro Pro Asn Ile Val Leu Glu Asp

225

230

235

240

Thr Gln Pro Phe Ser Gln Pro Met Val Gly Ser Pro Asn Val Tyr His

245

250

255

Ser Leu Pro Cys Thr Pro His Thr Gly Ala Glu Asp Ala Glu Gln Ala

260

265

270

Ala Gly Arg Lys Thr Gln Ser Ser Gly Pro Gly Leu Gln Lys Asn Ser

275

280

285

Glu Cys Val Ala Leu Val Ala Trp Ser Gln Ile

290

295

<210> 18  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 atggctgacc acaaccc 17

<210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 19  
 ctaaatttgg ctccaggcc 19

【 0 0 3 8 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

リガンド依存的な P P A R  $\gamma$  相互作用因子と P P A R  $\gamma$  の結合におけるアゴニスト選択性を示す図である。

【図 2】

糖尿病モデルマウス K K<sup>ay</sup> および d b d b と正常マウスにおける E c h 1 発現量の比較を示す図である。

【図 3】

E c h 1 の組織別発現分布を示す図である。

【図4】

ECHLPによるPPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対する抑制作用を示す図である。

【図5】

AOP2によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対する促進作用を示す図である。

【図6】

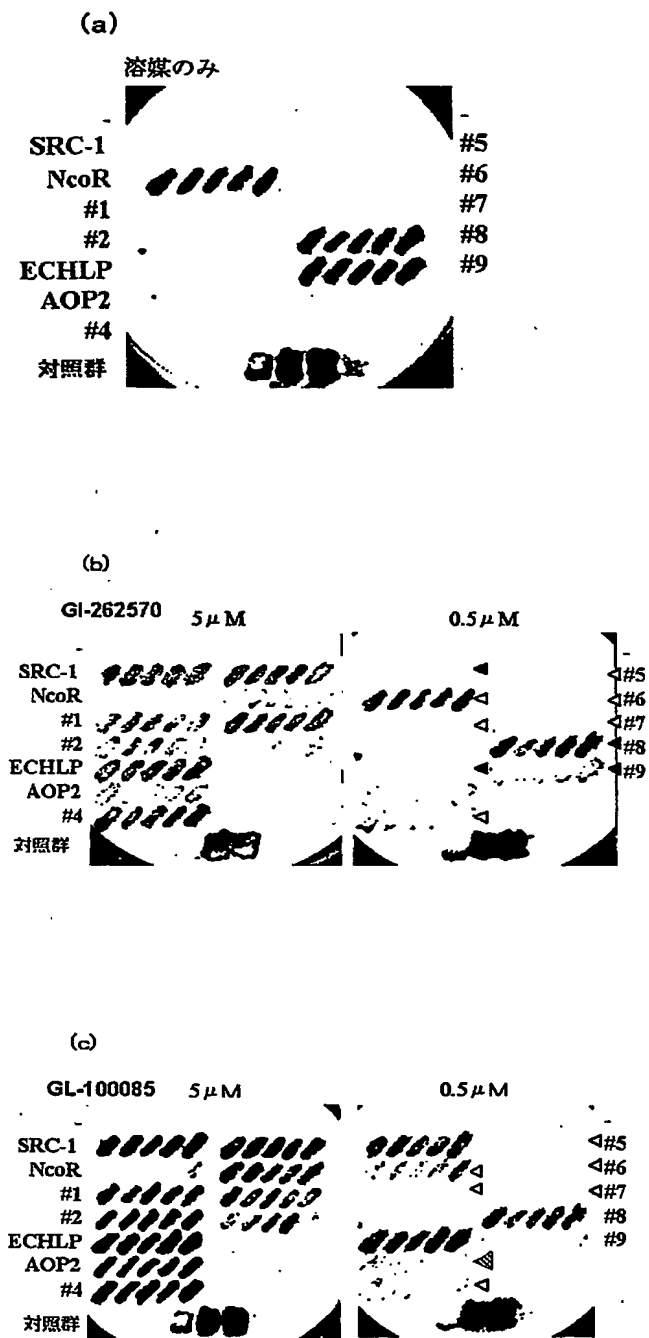
ECHLP、AOP2によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対する作用を利用した主作用特異的なPPAR $\gamma$ リガンドのスクリーニングを示す図である。

【図7】

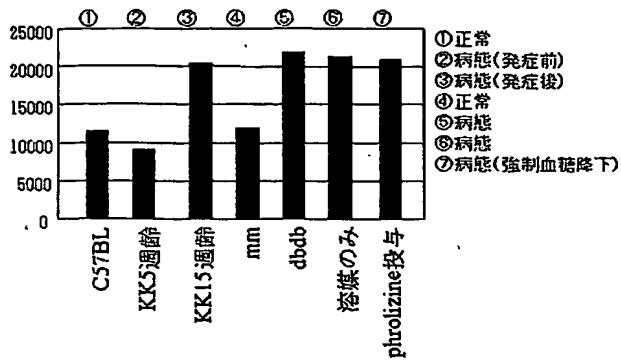
FLJ13111によるPPAR $\gamma$ のリガンド依存的転写誘導能に対する促進作用を示す図である。

【書類名】 図面

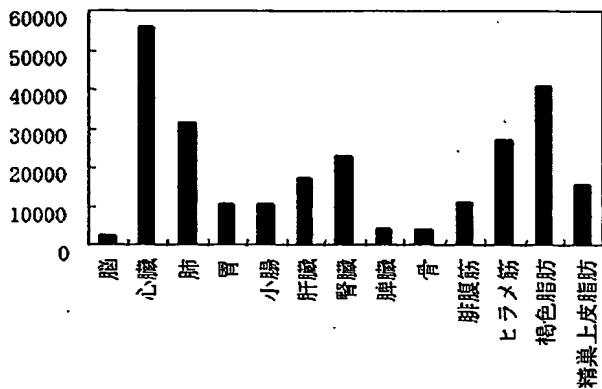
【図 1】



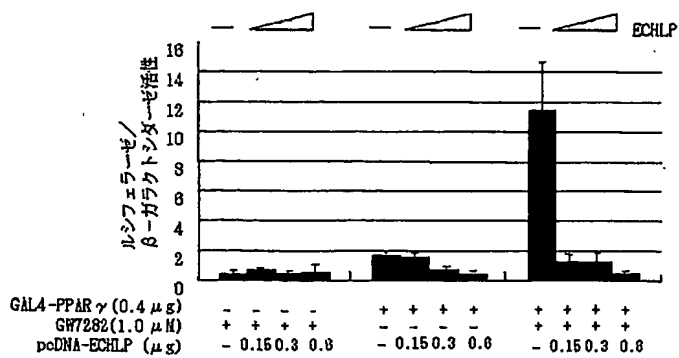
【図 2】



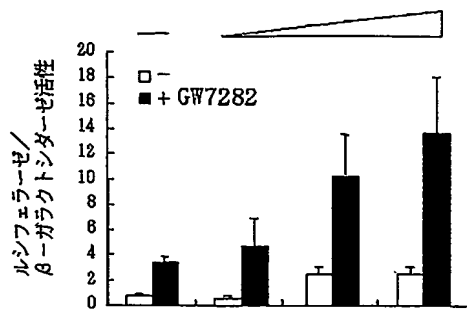
【図 3】



【図 4】

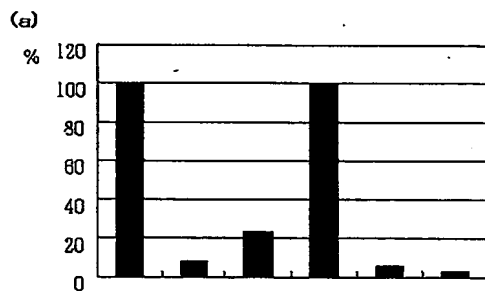


【図 5】



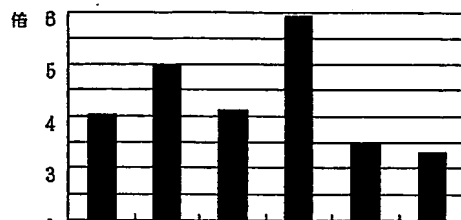
GAL4-PPAR $\gamma$ (0.4 $\mu$ g)	+	+	+	+
GW7282 (1.0 $\mu$ M)	+	+	+	+
pcDNA-AOP2 ( $\mu$ g)	-	0.15	0.3	0.6

【図 6】



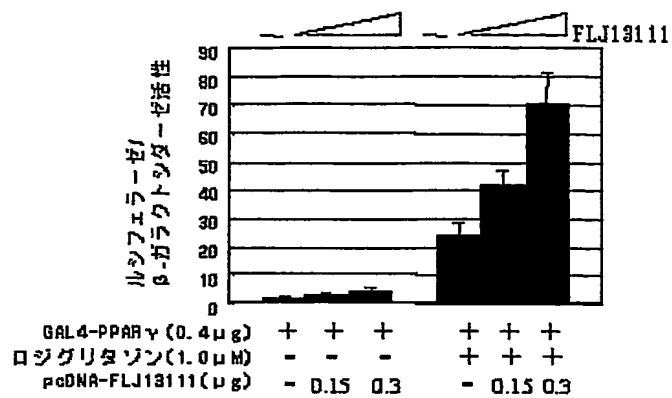
GAL4-PPAR $\gamma$ (0.4 $\mu$ g)	+	+	+	+	+	+
ECHLP ( $\mu$ g)	-	0.6	0.6	-	0.6	0.6
GW7282 (0.1 $\mu$ M)	+	+	+	+	+	+
GI-262570 ( $\mu$ M)	-	1.0	10	-	-	-
GL-100085 ( $\mu$ M)	-	-	-	-	1.0	10

(b)



GAL4-PPAR $\gamma$ (0.4 $\mu$ g)	+	+	+	+	+	+
AOP2 ( $\mu$ g)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
GW7282 (0.1 $\mu$ M)	1.0	10	-	-	-	-
GL-100085 ( $\mu$ M)	-	-	1.0	10	-	-
GI-262570 ( $\mu$ M)	-	-	-	-	1.0	10

【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬をスクリーニングするのに有用なツールとなるリガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法、そして、該蛋白質を利用した副作用と乖離したインスリン抵抗性改善薬のスクリーニング方法を提供することにある。

【解決手段】 リガンド依存的にPPARと相互作用する蛋白質をスクリーニング法により、主作用リガンド依存性PPAR結合分子ECHLP、主作用リガンド選択的PPAR $\gamma$ 作用因子FLJ13111及び副作用リガンド依存性PPAR結合分子AOP2を得た。更に、PPAR相互作用ECHLP、PPAR相互作用FLJ13111及びPPAR相互作用AOP2を用いることにより、主作用を選択的にもたらし副作用を引き起こさないインスリン抵抗性改善薬の検出・スクリーニングを可能にした。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-257703
受付番号	50201314383
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月 3日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006677]

1. 変更年月日 1990年 8月10日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号  
氏 名 山之内製薬株式会社